

**Der Einfluss einer antenatalen Glukokortikoidtherapie  
auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette  
im fetalen Gehirn**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Gunther Wichmann**  
geboren am 30.03.1980 in Beckendorf-Neindorf

Gutachter:

1. ....
2. ....
3. ....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

11 $\beta$ -HSD 2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2
Abb.	Abbildung
ACTH	Adreno-Corticotropes Hormon
AG	Arbeitsgruppe
AIF	Apoptose-Induzierender Faktor
ÄMM	Äußere Mitochondrienmembran
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BM	Betamethason
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CoA	Coenzym A
CS	Citratsynthase
Cyt c	Cytochrom c
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ECoG	Elektrokortigramm
FG	Frischgewicht
GC	Glukokortikoid
GLUT	Glukosetransportprotein
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glukokortikoid-Responsives Element
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
i.m.	intramuskulär
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IVH	Intraventrikuläre Hirnblutung
KG	Körpergewicht
LRI	Lungenreifeinduktionstherapie
LW	Leerwert
MAP	Mikrotubulus-Assoziierte Proteine

MBP	Myelin-Basisprotein
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MW	Mittelwert
mt-DNA/RNA	mitochondriale DNA/RNA
n-DNA/RNA	nukleäre DNA/RNA
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCP	Nicht-Kollagenes Protein
NIH	National Institutes of Health
PCr	Phosphocreatin
RDS	Respiratory Distress Syndrome (Atemnotsyndrom)
REM	Rapid Eye Movement
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Retinopathy of Prematurity (Frühgeborenenretinopathie)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SSW	Schwangerschaftswoche
Susp.	Suspension
ZNS	zentrales Nervensystem

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 KLINISCHE BEDEUTUNG DER ANTENATALEN GLUKOKORTIKOIDTHERAPIE .....	1
1.2 EFFEKTE DER ANTENATALEN GLUKOKORTIKOIDTHERAPIE .....	3
1.2.1 Plazentagängigkeit von Glukokortikoiden.....	3
1.2.2 Induktion der fetalen Lungenreifung.....	4
1.2.3 Prävention weiterer perinataler Komplikationen .....	5
1.2.4 Nebenwirkungen.....	6
1.2.4.1 Kardio- und zerebrovaskuläre Effekte.....	6
1.2.4.1.1 Akute kardio- und zerebrovaskuläre Effekte.....	6
1.2.4.1.2 Chronische kardio- und zerebrovaskuläre Effekte .....	6
1.2.4.2 Zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie .....	8
1.2.4.2.1 Mechanismen der Glukokortikoidwirkung im Gehirn .....	8
1.2.4.2.2 Akute zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie .....	9
1.2.4.2.3 Chronische zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie.....	14
1.3 DIE ROLLE DER MITOCHONDRIEN IM ENERGISTOFFWECHSEL DER ZELLE .....	15
1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien .....	15
1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung.....	18
1.3.2.1 Prinzip der oxidativen Phosphorylierung .....	18
1.3.2.2 Die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	19
1.3.2.2.1 Komplex I: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase .....	19
1.3.2.2.2 Komplex II: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase.....	20
1.3.2.2.3 Komplex III: Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase.....	20
1.3.2.2.4 Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase (COX) .....	20
1.3.2.3 Der F <sub>1</sub> /F <sub>0</sub> -ATP-Synthase-Komplex .....	21
1.3.2.4 Bedeutung des Systems der oxidativen Phosphorylierung im zellulären Energistoffwechsel für die neuronale Zellfunktion .....	21

1.3.2.5	Die Rolle des Systems der oxidativen Phosphorylierung bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	22
1.3.2.6	Die Rolle des Systems der oxidativen Phosphorylierung in der Apoptose ..	23
1.4	STÖRUNGEN DER MITOCHONDRIENFUNKTION DURCH GLUKOKORTIKOIDE .....	23
1.4.1	<i>Mechanismen der Glukokortikoidwirkung auf die Mitochondrienfunktion</i> .....	23
1.4.1.1	Nukleärgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen.....	24
1.4.1.2	Mitochondrialgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen.....	25
1.4.1.3	Nichtgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen.....	25
1.4.2	<i>Spezifische Glukokortikoideffekte auf die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe</i> .....	26
<b>2</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>30</b>
3.1	EXPERIMENTELLES PROTOKOLL UND HIRNPROBENGEWINNUNG .....	30
3.2	AKTIVITÄTSMESSUNGEN DER ENZYMKOMPLEXE DER ATMUNGSKETTE .....	31
3.2.1	<i>Chemikalien</i> .....	31
3.2.2	<i>Aufarbeitung des Hirngewebes</i> .....	31
3.2.3	<i>Proteinbestimmung</i> .....	32
3.2.4	<i>Bestimmung von Enzymaktivitäten mittels Absorptionsspektrometrie</i> .....	33
3.2.4.1	Aktivitätsbestimmung des mitochondrialen Markers Citratsynthase (CS) ..	35
3.2.4.2	Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette .....	36
3.2.4.2.1	Komplex I + III (NADH-Cytochrom-c-Reduktase) .....	36
3.2.4.2.2	Teil von Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, SDH).....	36
3.2.4.2.3	Komplex II + III (Succinat-Cytochrom-c-Reduktase) .....	37
3.2.4.2.4	Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase, COX) .....	37
3.3	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ATP .....	38
3.3.1	<i>Chemikalien</i> .....	38
3.3.2	<i>Aufarbeitung des Hirngewebes</i> .....	38
3.3.3	<i>Prinzip der Konzentrationsbestimmung von ATP mittels Fluoreszenzspektrometrie</i> .....	39
3.3.4	<i>Konzentrationsbestimmung von ATP mittels Absorptionsspektrometrie</i> .....	41
3.4	STATISTISCHE ANALYSEN .....	43

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
4.1	GLUKOKORTIKOIDEFFEKTE AUF DIE AKTIVITÄTEN DER ENZYMKOMPLEXE DER ATMUNGSKETTE .....	44
4.1.1	<i>Vorbetrachtungen und Bezugsgrößen .....</i>	44
4.1.1.1	Proteingehalt nach Lowry.....	45
4.1.1.2	Spezifische Aktivität des mitochondrialen Markers Citratsynthase.....	46
4.1.2	<i>Glukokortikoideffekte auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette</i> .....	47
4.1.2.1	NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III).....	47
4.1.2.2	Succinat-Dehydrogenase (Teil von Komplex II).....	50
4.1.2.3	Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III) .....	52
4.1.2.4	Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV).....	54
4.2	GLUKOKORTIKOIDEFFEKTE AUF DIE KONZENTRATION VON ATP .....	57
4.2.1	<i>Vorversuche mittels Fluoreszenzspektrometrie .....</i>	57
4.2.2	<i>Glukokortikoideffekte auf die Konzentration des Energieträgers ATP .....</i>	58
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
5.1	DISKUSSION DER METHODE .....	61
5.1.1	<i>Das fetale Schaf als Tiermodell.....</i>	61
5.1.2	<i>Verwendete Dosierungen von Betamethason .....</i>	61
5.1.3	<i>Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette.....</i>	62
5.1.3.1	Methoden zur Beurteilung der Funktion des Systems der oxidativen Phosphorylierung.....	62
5.1.3.1.1	Methoden der Aufarbeitung des Gewebematerials .....	64
5.1.3.1.2	Einflussfaktoren auf die Messergebnisse der Aktivitätsbestimmungen ...	66
5.1.4	<i>Bestimmung der Konzentration von ATP .....</i>	68
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	69
5.2.1	<i>Plausibilität der gemessenen Enzymaktivitäten .....</i>	69
5.2.2	<i>Regionale Unterschiede von Proteingehalt, Mitochondriengehalt und Enzymaktivitäten.....</i>	70
5.2.3	<i>Glukokortikoideffekte auf die mitochondriale Aktivität.....</i>	71
5.2.3.1	Überblick über die Effekte .....	71
5.2.3.2	Glukokortikoideffekte auf die Bezugsgrößen Protein- und Mitochondriengehalt.....	72

5.2.3.3	Glukokortikoideffekte auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette.....	75
5.2.3.4	Potentielle Mechanismen der Glukokortikoideffekte auf die Aktivität der Enzymkomplexen der Atmungskette.....	78
5.2.3.4.1	Genomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	79
5.2.3.4.2	Nichtgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	81
5.2.3.4.3	Regionalspezifische Unterschiede der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	83
5.2.3.4.4	Dosisunabhängigkeit der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	84
5.2.3.5	Bedeutung der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.....	85
5.2.4	<i>Glukokortikoideffekte auf die Konzentration von ATP.....</i>	<i>89</i>
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>92</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>XL</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>XLI</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>XLII</b>



## ZUSAMMENFASSUNG

Die antenatale Behandlung mit Glukokortikoiden stellt eine effektive Therapie zur Prävention des kindlichen Atemnotsyndroms und periventrikulärer Hirnblutungen unreifer Frühgeborener dar und trägt damit maßgeblich zur Senkung der neonatalen Mortalität bei. Etwa jeder zehnten Schwangeren wird derzeit aufgrund drohender Frühgeburt zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche (SSW) ein Behandlungszyklus Betamethason (BM), bestehend aus 2 x 12 mg im Abstand von 24 h, verabreicht. Unterdessen werden zunehmend kardiale, vaskuläre, und zerebrale Nebenwirkungen der antenatalen Glukokortikoidgabe beschrieben. Zu den akuten Effekten von Glukokortikoiden auf das fetale Gehirn zählen die Abnahme der fetalen Hirndurchblutung, Änderungen der elektrokortikalen Hirnaktivität und der Verlust von synaptischen und zytoskelettalen High-Turnover-Proteinen.

Eine Ursache dieser Effekte ist wahrscheinlich der durch katabole Effekte von Glukokortikoiden gehemmte zerebrale Energiestoffwechsel. Dieser kann über die Beeinträchtigung des neuronalen Membranpotentials, über die verminderte Proteinexpression und sekundär (durch die Kopplung von Metabolismus und Hirndurchblutung) über die Abnahme der Hirndurchblutung zu der veränderten elektrischen Hirnfunktion führen. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Glukoseaufnahme in das Gehirn nicht beeinträchtigt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb den Einfluss einer antenatalen Glukokortikoidtherapie in klinischer Dosis auf die Funktion der mitochondrialen Atmungskette als wesentlichen Faktor für die mitochondriale ATP-Produktion zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden am fetalen Schaf, dem gängigsten Tiermodell für die menschliche Fetalperiode, an dem auch die antenatale Glukokortikoidtherapie entwickelt wurde, durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0,73 des Gestationsalters, das entspricht ca. der 28. SSW beim Menschen, wurde den Muttertieren antenatal entweder eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung oder BM in der klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis appliziert. Da es Dosis-Wirkungs-Untersuchungen weder bezüglich der erwünschten BM-Effekte noch der unerwünschten zerebralen Nebenwirkungen gibt, untersuchten wir auch die Effekte der Hälfte und eines Viertels der Dosis. 24 h nach der Behandlung bestimmten wir mittels Absorptionsspektrometrie die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I + III, II + III und IV sowie der Succinat-Dehydrogenase (Teil von Komplex II) im unfraktionierten Homogenat fetaler Gewebeproben vom zerebralen Kortex, Thalamus, Striatum und

Hippokampus. Die spektrophotometrische Bestimmung der Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Citratsynthase (CS) gab Auskunft über den Mitochondriengehalt. Die Aktivitäten wurden auf den Proteingehalt normiert. Durch die Normierung auf den Mitochondriengehalt über die Aktivität der CS und die Angabe als CS-normierte Aktivität konnten die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe unabhängig vom Mitochondriengehalt dargestellt werden.

Sowohl der Proteingehalt als auch der Mitochondriengehalt waren im zerebralen Kortex am niedrigsten, was auf einen hohen Wassergehalt und einen niedrigen Mitochondriengehalt in dieser Region hinweist. BM führte zu Aktivitätsminderungen von Komplex I + III und Komplex IV selektiv im zerebralen Kortex. Da die Aktivitäten von Komplex II + III sowie der SDH als Teil von Komplex II nach BM unverändert blieben, bedeutet die Aktivitätsminderung von Komplex I + III eine spezifische Hemmung des Komplex I durch BM. Die Hemmung der Atmungskettenkomplexe durch BM beschränkte sich damit auf Komplexe, deren katalytische Untereinheiten nicht nur durch das nukleäre sondern auch durch das mitochondriale Genom kodiert sind. Dies kommt auch in den Minderungen der SDH-normierten Aktivitäten von Komplex I + III und IV im zerebralen Kortex zum Ausdruck. Die SDH ist als Teil von Komplex II ausschließlich nukleär kodiert. Damit war die Hemmung der Atmungskettenkomplexe I und IV wahrscheinlich durch mitochondrial-genomische Mechanismen der Glukokortikoidwirkungen vermittelt. Die spezifische Hemmung von Komplex I und Komplex IV durch BM war in dem von uns verwendeten Bereich der Dosierung dosisunabhängig. Das weist darauf hin, dass die klinisch verwendete Dosis bezüglich der Funktion der Atmungskette supramaximal ist.

Die eingeschränkte Funktion der Atmungskettenkomplexe hat einen potentiell hemmenden Effekt auf die ATP-Synthese im zerebralen Kortex. Da uns die Bestimmung der ATP-Konzentrationen wahrscheinlich aufgrund einer unzureichenden Konservierung der energiereichen Metabolite bei der Probenentnahme nicht gelang, ist dies in zukünftigen Experimenten zu untersuchen.

Damit ist die Hemmung der Atmungskettenkomplexe durch BM eine potentielle Ursache für eine Vielzahl der zerebralen Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie. Dosis-Wirkungs-Untersuchungen sowohl hinsichtlich der erwünschten als auch unerwünschten BM-Effekte sind notwendig, um die minimale noch wirksame und damit nebenwirkungsärmste Dosierung zu finden. Bis dahin sollte die Indikation zu der für den Feten lebensrettenden Therapie möglichst eng gestellt werden.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 KLINISCHE BEDEUTUNG DER ANTENATALEN GLUKOKORTIKOIDTHERAPIE

Die Geburt stellt hohe Anforderungen an das neue Leben. Binnen kürzester Zeit werden die Organsysteme des Neugeborenen extremen, zuvor ungekannten Belastungen ausgesetzt. Der erste Atemzug, mit dem die zuvor flüssigkeitsgefüllten Alveolen der Lunge den Gasaustausch bewältigen müssen, und die folgende Umstellung des Blutkreislaufs, die die vom Nabelschnurblut unabhängige Versorgung des Neugeborenen mit Sauerstoff und Nährstoffen einleitet, markieren besonders entscheidende Momente im Verlauf der postnatalen Anpassungsphase. Um den dramatischen Änderungen erfolgreich begegnen zu können, muss der fetale Organismus pränatal umfangreiche Reifungsprozesse durchlaufen, die für die postnatale Entwicklung grundlegend und für das Überleben außerhalb der schützenden Hüllen der Gebärmutter essentiell sind.

Da die Entwicklung entscheidender Strukturen der überlebenswichtigen Organsysteme vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) noch nicht abgeschlossen und deren Funktion somit teilweise eingeschränkt ist, stellt eine Frühgeburt das Hauptrisiko für das Auftreten postnataler Anpassungsstörungen mit möglicher Todesfolge innerhalb des ersten Lebensjahres dar (Kelly 2006). Etwa 70 % aller Todesfälle Neugeborener und bis zu 75 % der neonatalen Erkrankungen in Industrienationen liegen Frühgeburten und einhergehende Komplikationen zugrunde (Wen et al. 2004). Neben gegenüber reifen Neugeborenen oftmals erhöhten Schweregraden üblicher Geburtskomplikationen, wie Ikterus, Anämie, Infektion und persistierendem Ductus arteriosus, sind die unreifen Kinder zusätzlich besonders häufig durch akute Zwischenfälle wie Atemnotsyndrom (RDS), intraventrikuläre Hirnblutungen (IVH), nekrotisierende Enterokolitis (NEC) und Frühgeborenenretinopathie (ROP) bedroht (Bonanno et al. 2007). Nicht selten zählen chronische Lungenerkrankungen (Kennedy 1999), neurologisch-kognitive Defizite (Goldenberg und Rouse 1998), neurologische Behinderungen und Entwicklungsauffälligkeiten (Wood et al. 2000) und Sehstörungen (Repka 2002) der Überlebenden zu den langfristigen Folgen. Entsprechend der tragenden Funktion des Atmungssystems, zählt das kindliche Atemnotsyndrom, das infolge unvollständiger Lungenreife des Frühgeborenen auftritt, zu den schwerwiegendsten Formen dieser Anpassungsstörungen (Crowley 2000) und bildet so die häufigste Ursache für perinatale Mortalität und Morbidität (Kelly 2006).

Der vor allem aufgrund zunehmender Mehrlingsschwangerschaften (Blondel et al. 2002, Warner et al. 2000) und eines gesellschaftlichen Trends zur späten Mutterschaft (Tough et al. 2002) zu beobachtende kontinuierliche Anstieg der Frühgeborenenrate (MacDorman et al. 2002, Martin et al. 2005) hat in den USA, laut aktueller epidemiologischer Studien, zu ihrem bisherigen Höhepunkt von ca. 12,7 % im Jahre 2005 geführt (Hamilton et al. 2006). Dennoch ist die Säuglingssterblichkeit im gleichen Zeitraum gesunken (Ananth et al. 2005, Joseph et al. 2002). Ähnliche Entwicklungen lassen sich in ganz Europa und anderen Industrienationen beobachten (Goldenberg 2002, Papiernik et al. 2003). In Deutschland liegt die Frühgeborenenrate (definitionsgemäß die Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche) derzeit bei ca. 9 % (Frieze et al. 2003). Maßgeblichen Anteil am erfreulichen Rückgang der perinatalen Mortalität entgegen dem internationalen Trend zur Frühgeburt trägt die zur Induktion der fetalen Lungenreifung entwickelte antenatale Glukokortikoidtherapie (Sauerwald und Rath 2000).

Da Maßnahmen zum Abwenden von Frühgeburten, wie Tokolyse, Cerclagen u. a. sich in Hinblick auf das neonatale Outcome bisher als nur mäßig erfolgreich erwiesen haben, liegt der Schwerpunkt der derzeitigen Therapien auf der optimalen Vorbereitung des Feten auf die Geburt, dem Verhindern traumatischer Geburtsverläufe und einer suffizienten postnatalen intensivmedizinischen Betreuung des Frühgeborenen, um die mit der fehlenden Reife auftretenden Risiken zu minimieren (Goldenberg 2002). Dank antenataler Glukokortikoidtherapie, exogener Surfactantgabe und neuer Beatmungsstrategien liegt die Überlebensrate für extrem untergewichtige Kinder unter 1000 g bei 70 % (Wapner und Waters 2003). Fast 80 % aller Babies, die vor der 28. SSW geboren werden, überleben (Wapner und Waters 2003).

Seit den Empfehlungen der National Institutes of Health (NIH 1995) zur Lungenreifeinduktionstherapie (LRI) ist die antenatale Glukokortikoidgabe zwischen der 24. und 34. SSW das Mittel der Wahl und ein Schwerpunkt der Behandlung bei drohender Frühgeburt in den nächsten 7 Tagen, um die Lungenreifung zu beschleunigen. Die Anwendungsrate antenataler Glukokortikoide bei Frühgeburt ist in den USA von ca. 20 % im Jahre 1990 stetig auf ca. 75 % im Jahre 2000 gestiegen (Meadow et al. 2003). Auch im Universitäts-Klinikum Jena werden Glukokortikoide zur Induktion der fetalen Lungenreifung routinemäßig antenatal eingesetzt. Da es sich um eine prophylaktische Maßnahme handelt, übersteigt die Zahl der Frauen, die wenigstens einmal pro Schwangerschaft Glukokortikoide erhalten, die Frühgeborenenrate sogar noch (Polyakov et al. 2007).

Neben der Minderung des Risikos für das Auftreten eines Atemnotsyndroms scheinen Glukokortikoide einen günstigen Einfluss auf eine Reihe weiterer perinataler Komplikationen zu haben. So zeigten sich nach antenataler Glukokortikoidtherapie auch Minderungen der Inzidenz und Schwere intraventrikulärer Blutungen (Ment et al. 1995) und periventrikulärer Leukomalazie (Canterino et al. 2001, Elimian et al. 1999), die v. a. im Rahmen hypoxisch-ischämischer Insulte auftreten (Berger und Garnier 1998). Damit verbunden ist ein geringeres Risiko für das Auftreten von fetalen Hirnschäden und infantilen Zerebralpareesen (Vohr et al. 2005). Die antenatale Glukokortikoidgabe vermindert außerdem die Risiken für das Auftreten von nekrotisierender Enterokolitis sowie Infektionen innerhalb der ersten 48 h (Elimian et al. 1999, Roberts und Dalziel 2006). Obwohl seither in zahlreichen Studien die aus all diesen Faktoren resultierende Senkung der perinatalen Sterblichkeit und ein verbessertes Outcome von Frühgeborenen eindeutig nachgewiesen werden konnten (Crowley 2000, Elimian et al. 1999, Roberts und Dalziel 2006, Vohr et al. 2005), bleiben viele Fragen ungeklärt.

Die unvollständige Kenntnis der genauen Wirkmechanismen und das große Nebenwirkungsprofil aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von Stresshormonen sowie die Bedeutung und häufige Anwendung einer antenatalen Glukokortikoidtherapie zur Förderung der Lungenreifung bei von Frühgeburt bedrohten Babies, machen die antenatale Glukokortikoidtherapie zum interessanten Gegenstand der aktuellen Forschung.

## **1.2 EFFEKTE DER ANTENATALEN GLUKOKORTIKOIDTHERAPIE**

### **1.2.1 Plazentagängigkeit von Glukokortikoiden**

Aufgrund der Unreife der fetalen Nebennierenrinde ist der Fetus bis auf die letzten Wochen der Schwangerschaft selbst nicht in der Lage Kortisol zu produzieren. Bis dahin steht er ausschließlich unter dem Einfluss des mütterlichen Kortisolspiegels, obwohl 80 – 90 % des mütterlichen Kortisols durch das plazentare Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD 2) inaktiviert werden, um den Fetus vor exzessiven Kortisolspitzen zu schützen (Benediktsson et al. 1997, Burton und Waddell 1999, Krozowski 1999, Shams et al. 1998). Im Gegensatz dazu wird der Übertritt von Betamethason und Dexamethason durch die Plazenta in den fetalen Blutkreislauf kaum gehemmt, da die 11 $\beta$ -HSD 2 nur eine niedrige Affinität für diese fluorierten synthetischen Glukokortikoide aufweist (Anderson et al. 1979, Blanford und Murphy 1977, Dancis et al. 1980, Levitz et al. 1978). Auf diese Weise sind durch die maternale Betamethason- bzw. Dexamethasongabe stark erhöhte fetale Glukokortikoidspiegel

bereits vor dem physiologischen Kortisolanstieg in den letzten Schwangerschaftswochen möglich.

### **1.2.2 Induktion der fetalen Lungenreifung**

Die Entwicklung der Lunge unterliegt komplexen Reifungsprozessen, die in der frühen Fetalperiode beginnen und sich auch nach der Geburt fortsetzen. Während der letzten fetalen Phase, der etwa zur Zeit der 24. SSW beginnenden sacculären Phase, sowie der alveolären Phase, die sowohl prä- als auch postnatal abläuft, bereiten wichtige Schritte wie die Bildung von Surfactant, die Reduktion des interstitiellen Gewebes und der Alveolarsepten, sowie die fortschreitende Zelldifferenzierung der epithelialen Gewebe den Feten auf den ersten Atemzug und den damit einsetzenden Gasaustausch vor (Bolt et al. 2001).

Sind diese Abläufe gestört oder werden sie durch eine Frühgeburt vor ihrer Vollendung unterbrochen, führt postnatal die progressive Atelektasenbildung zu einer eingeschränkten Lungenfunktion mit respiratorischer Insuffizienz. Dies ist die kindliche Form des Atemnotsyndroms (RDS) (Nichols und Gross 1992). Nach wie vor ist das Atemnotsyndrom, welches bei 1 % aller Neugeborenen auftritt, die häufigste Todesursache in der Neonatalperiode. Bei Frühgeborenen vor der 30. SSW liegt die Inzidenz des Atemnotsyndroms mit 60 % noch sehr viel höher (von Harnack und Koletzko 2000).

Die entscheidende Rolle körpereigener Kortikoide ist bei etlichen fetalen Reifungsprozessen verschiedener Gewebe und Organsysteme zumindest im Tierversuch seit langem gesichert (Liggins 1976, Liggins 1994a). Auch für Menschen ist ein Anstieg der fetalen Kortisolsekretion in der späten Fetalperiode unter anderem für die anatomische und funktionelle Lungenreifung und damit für das extrauterine Überleben essentiell (Brooks et al. 1996, Liggins 1994b). Die Lungenreifeinduktionstherapie mit den fluorierten synthetischen Glukokortikoiden Dexamethason und Betamethason kann den physiologischen Kortisolanstieg vereinfacht gesprochen „simulieren“ und die für eine regelrechte Lungenfunktion notwendigen Reifungsprozesse auf diese Weise beschleunigen (Ward 1994). Liggins (1969) war es, der herausfand, dass zu früh geborene Schaffeten weniger Atemprobleme hatten und reifere Lungen sowie insgesamt eine geringere Mortalität aufwiesen, wenn sie in utero Glukokortikoiden ausgesetzt waren. Er entwickelte daraus am Schafmodell die antenatale Glukokortikoidtherapie. In einer kontrollierten Studie, an der Frauen mit einer Risikoschwangerschaft teilnahmen, konnte 1972 zum ersten Mal der

Rückgang des Atemnotsyndroms der Neugeborenen um bis zu 30 % durch eine maternale Glukokortikoidgabe gezeigt werden (Liggins und Howie 1972).

Zu den wichtigsten Wirkungen von Glukokortikoiden im Sinne der Lungenreifung zählt v. a. die erhöhte alveoläre Produktion von Surfactant (Gross 1990). Aber nur im Zusammenspiel mit der beschleunigten Differenzierung parenchymaler Strukturen, verminderter vaskulärer Permeabilität und verbesserter Clearance des Lungenwassers führt diese zur Erhöhung von Lungenvolumen und -compliance und schafft so die Voraussetzungen für eine überlebenswichtige, ausreichende Lungenfunktion (Ballard und Ballard 1995). Eine unterstützende Substitutionstherapie Frühgeborener mit Surfactant kann das Risiko für das Auftreten des Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen noch verringern (Jobe 1993, Jobe et al. 1993) und, durch die antenatale Glukokortikoidgabe vorbereitet, die perinatale Sterblichkeit weiter senken (Ballard und Ballard 1995).

Nach der Geburt und mit dem Einsetzen der Atmung treten plötzlich erhöhte O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf, die besonders bei einer Beatmungstherapie schädigend auf das Gewebe einwirken. Die Aktivitätssteigerung antioxidativer Enzyme in der Lunge nach antenataler Glukokortikoidtherapie wirkt protektiv gegen den postnatalen oxidativen Stress, trägt zum Erhalt der Lungenfunktion bei, schützt vor Beatmungsschäden und chronischen Lungenerkrankungen und unterstützt so die Therapie des RDS (Frank et al. 1985).

### **1.2.3 Prävention weiterer perinataler Komplikationen**

Über die Induktion der Lungenreifung hinaus wird die perinatale Sterblichkeit durch präventive Effekte der antenatalen Glukokortikoidtherapie auf andere schwerwiegende Geburtskomplikationen weiter gesenkt (s. Kap. 1.1). Insbesondere die Minderungen von Inzidenz und Schwere zerebraler Schäden infolge intraventrikulärer Blutungen (Ment et al. 1995) und periventrikulärer Leukomalazie (Agarwal et al. 2002, Canterino et al. 2001) tragen zu einer Verbesserung des neonatalen Outcomes insgesamt bei (Crowley 2000, Elimian et al. 1999, Roberts und Dalziel 2006, Vohr et al. 2005). Des Weiteren wurden auch Minderungen der Risiken für das Auftreten von nekrotisierender Enterokolitis und Infektionen innerhalb der ersten 48 h nach Geburt und, damit verbunden, die seltener notwendige intensivmedizinische Betreuung beschrieben (Elimian et al. 1999, Roberts und Dalziel 2006).

## **1.2.4 Nebenwirkungen**

### **1.2.4.1 Kardio- und zerebrovaskuläre Effekte**

Neben den günstigen Einflüssen von Glukokortikoiden auf die fetale Entwicklung und Reifung verschiedener Organsysteme (s. Kap. 1.2.2 und 1.2.3) können zu hohe Glukokortikoidspiegel aber auch negative Effekte auf deren Funktion und Entwicklung haben. So wurden zunehmend Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie gefunden, die insbesondere das Herz-Kreislauf-System und das Gehirn betreffen (Bennet et al. 1999, Derks et al. 1997, McMillen und Robinson 2005, Schwab 2007, Sloboda et al. 2005).

#### ***1.2.4.1.1 Akute kardio- und zerebrovaskuläre Effekte***

Sowohl bei Schafen (Derks et al. 1997, Löhle et al. 2005, Reinhardt et al. 2007, Schwab et al. 2000, Tangelakis et al. 1992) und Primaten (Koenen et al. 2002) als auch bei frühgeborenen Babys (Demarini et al. 1999, Kari et al. 1994) führte die antenatale Gabe von Glukokortikoiden durch die Induktion einer endothelialen Dysfunktion (Anwar et al. 1999) zu einer peripheren Vasokonstriktion. Durch eine Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase und der Cyclooxygenase kam es zu einer zerebralen Vasokonstriktion (Schwab et al. 2004). Die Folgen waren ein unmittelbarer Anstieg des fetalen mittleren arteriellen Blutdrucks und eine Minderung des zerebralen Blutflusses.

#### ***1.2.4.1.2 Chronische kardio- und zerebrovaskuläre Effekte***

Neben diesen experimentell nachgewiesenen akuten Effekten auf das Herz-Kreislauf-System haben große epidemiologische Studien in den letzten Jahren gezeigt, dass Menschen mit einem niedrigen Geburtsgewicht, welches auf intrauterinen Stress hindeutet, unabhängig von postnatalen Risikofaktoren eine Prädisposition für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt und Schlaganfall) entwickeln (Barker 1998).

Prinzipiell können zwei Mechanismen für die Beeinflussung der Funktion physiologischer Systeme im späteren Leben durch pränatalen Stress unterschieden werden, die eng miteinander verflochten sind und hauptsächlich durch Kortisol und Wachstumshormone vermittelt werden:



1. die Modulation der Reifung physiologischer Systeme, die bereits während der Entwicklung zur Ausprägung von klinischen Auffälligkeiten führen können.

Hier sind als Beispiele die Beeinflussung der Reifung der endothelialen Funktion und der Funktion des autonomen Nervensystems zu nennen. So bewirkt die antenatale Betamethasonbehandlung beim Schaf eine dauerhafte endotheliale Dysfunktion, die noch bei drei Monate alten Lämmern nachweisbar war (Molnar et al. 2003). Außerdem war die Reifung der autonomen Funktion und des Barorezeptorreflexes gestört, deren Dysfunktion eine dauerhafte Störung der Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems bewirken kann (Frasch et al. 2007).

2. programmierende Effekte auf die Funktion physiologischer Systeme im späteren Leben.

Diese Effekte bilden eine Prädisposition für Erkrankungen im späteren Leben, wie z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, werden klinisch erst im späteren Leben beim Auftreten weiterer Risikofaktoren deutlich und können über die Geburt hinaus, mitunter bis ins hohe Alter hinein, in teilweise erheblichem Maße die gesamten Voraussetzungen für die Entstehung von Krankheiten bestimmen (McMillen und Robinson 2005, Nyirenda und Seckl 1998, Schwab 2007, Sloboda et al. 2005, Welberg und Seckl 2001). Die dauerhafte Änderung der Aktivität physiologischer Systeme durch pränatale Umweltfaktoren wird als fetale Programmierung bezeichnet. Eine bedeutende Rolle bei der fetalen Programmierung spielt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse). Durch erhöhte Kortisolspiegel kann die Funktion der HHN-Achse, deren Entwicklung bei Schaf und Mensch im letzten Abschnitt der Schwangerschaft stattfindet, dauerhaft beeinflusst werden (Challis und Brooks 1989, Challis et al. 2001, Welberg und Seckl 2001). Dabei kommt es zu einer Desensitivierung der in die negative Rückkopplung der HHN-Achse involvierten Glukokortikoidrezeptoren im Hippokampus und zu einer Sollwertverstellung im Sinne einer verminderten negativen Rückkopplung der HHN-Achse (Matthews 2001). Aufgrund der dann während der Reifung als „normal“ angesehenen erhöhten Kortisolspiegel werden höhere Kortisolspiegel in der Folge zeitlebens toleriert, und in Stresssituationen wird vermehrt Kortisol ausgeschüttet (McMillen und Robinson 2005). Diesen Effekt kann in verschiedenen Spezies bis hin zu nichtmenschlichen Primaten sowohl perinataler Stress, antenatale Glukokortikoidgabe in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung genutzten Dosis als auch eine Mangelernährung auslösen (Huizink et al. 2004, Sloboda et al. 2005, Welberg und Seckl

2001). Bei Schafen war so drei Wochen nach einer antenatalen Glukokortikoidgabe in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis eine Hyperaktivität der Stressachse mit vermehrter ACTH- und Kortisolausschüttung auf einen hypertensiven Reiz hin nachweisbar (Schwab 2007). Ein weiteres Beispiel ist eine Störung der Nephrogenese, die über eine damit verbundene Störung der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Wintour et al. 2003a, Wintour et al. 2003b) zu einer Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter führt (Barker 1998, Barker et al. 1990). Der fetalen Programmierung unterliegt außerdem die Entwicklung eines metabolischen Syndroms über die Entwicklungsstörungen des Pankreas und der Leber sowie über die Entwicklung einer Insulinresistenz im Fettgewebe (Barker et al. 1990, Barker et al. 1993, McMillen und Robinson 2005).

#### **1.2.4.2 Zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie**

##### ***1.2.4.2.1 Mechanismen der Glukokortikoidwirkung im Gehirn***

Für die normale Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) und die physiologischen Abläufe der komplexen Hirnreifungsstadien sind körpereigene Glukokortikoide (Kortisol bei Mensch und Schaf) von essentieller Bedeutung (De Kloet et al. 1993). Das Wirkungsspektrum von Glukokortikoiden auf das sich entwickelnde Gehirn umfasst Effekte auf neuronales Wachstum und subzelluläre Reorganisation sowie neuronal-neuronale und neuronal-gliale Interaktionen (Matthews 2001).

Glukokortikoide wirken vornehmlich über intrazelluläre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren fungieren und in zwei verschiedene Rezeptortypen eingeteilt werden können. Im Hirn treten zytoplasmatische Glukokortikoide bindende Rezeptoren vom Typ I (Mineralocorticoidrezeptoren, MR) hauptsächlich im Hippokampus und Hypothalamus auf (Ahima und Harlan 1990). Ihre Aktivierung durch körpereigene Glukokortikoide (Kortikosteron bei der Ratte) erfolgt schon unter Basalbedingungen und geht mit neuroprotektiven Effekten im adulten Rattengehirn einher (Hassan et al. 1996). Dagegen kommen Glukokortikoidrezeptoren vom Typ II (GR) in nahezu allen Hirnregionen einschließlich des zerebralen Kortex vor (Ahima und Harlan 1990, Cintra et al. 1994). In der weißen Substanz von Schaffeten werden sie bereits ab dem Zeitpunkt 0,53 der Gestationsdauer exprimiert (Rose et al. 1985). Eine Aktivierung erfolgt jedoch erst bei physiologisch erhöhten Glukokortikoidspiegeln und resultierender Sättigung der Typ-I-

Rezeptoren, wie sie im Blut bei Stress auftreten, und vermittelt im Rattengehirn katabole, neurotoxische und apoptoseinduzierende Effekte sowie eine Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (Hassan et al. 1996, Joels und de Kloet 1994, Packan und Sapolsky 1990). Das Wirkprofil des jeweiligen Kortikoidhormons wird durch dessen Affinität zu den beiden Rezeptortypen und der Konzentration am Wirkort bestimmt. Die für die Lungenreifeinduktion verwendeten synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason sind bevorzugte Agonisten der Typ-II-Rezeptoren und besitzen gegenüber Kortisol, dem körpereigenen Glukokortikoid des Menschen, eine höhere glukokortikoide Wirkpotenz (Yang et al. 1990). Ihre antenatale Gabe bedeutet daher schon bei geringen Konzentrationen eine Verschiebung des natürlichen Aktivierungsmusters im Sinne einer Stressantwort. Viele beobachtete zerebrale Wirkungen der antenatalen Glukokortikoidtherapie werden möglicherweise auf diesem Wege vermittelt.

Darüber hinaus sind auch nichtgenomische Wirkmechanismen beschrieben worden (Falkenstein et al. 2000, McEwen 1991). Membranrezeptorvermittelte Effekte und Änderungen der Ionenpermeabilität zellulärer Membranen durch Glukokortikoide dienen v. a. als Erklärung für Effekte, die sich durch das Fehlen der für die genomischen Wirkungen typischen Latenzzeit auszeichnen (Schömig und Taubert 2007).

#### ***1.2.4.2.2 Akute zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie***

Sowohl experimentell als auch beim Menschen sind akute Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie auf die elektrokortikale Hirnfunktion sowie den Gehalt wesentlicher zerebraler Strukturproteine beschrieben worden.

So konnte die Arbeitsgruppe von PD Dr. Schwab nach antenataler Glukokortikoidgabe mittels nichtlinearer Analyse des Elektrokortigramms (ECoG) einen akuten Einfluss der Lungenreifeinduktionstherapie auf die elektrische Hirnfunktion fetaler Schafe zeigen (Schwab et al. 2001a). Dabei nahm die Komplexität des fetalen ECoG-Signals während der REM.-Schlafphase 18 - 24 h nach Injektion ab, um in den folgenden 24 h wieder auf Normalniveau anzusteigen. Ein auf diese Weise veränderter Funktionszustand des Hirns stellt eine mögliche Ursache für die beim Menschen beobachtete akute Minderung fetaler Körper- und Atembewegungen sowie der fetalen Herzfrequenzvariabilität nach maternaler Glukokortikoidgabe dar (Mulder et al. 1997, Senat et al. 1998). Tatsächlich bestätigten magnetenzephalographische Untersuchungen auch beim Menschen Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf die fetale kortikale Hirnfunktion, indem nachgewiesen werden

konnte, dass sie die Latenz kortikaler akustisch evozierter Potentiale verzögert (Schleussner et al. 2004). Ein Effekt auf die elektrokortikale Hintergrundaktivität lässt sich mittels MEG aufgrund des schlechten Signal-Rauschabstandes des MEG-Signals nicht untersuchen.

Gleichzeitig zeigten sich in einigen Hirnregionen des fetalen Schafes Verluste sog. High-Turnover-Proteine, wie Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) und Synaptophysin, die mit den ECoG-Veränderungen (Schwab et al. 2001a) einhergingen. MAP sind Zytoskelettproteine, die wichtige Funktionen in der neuronalen Morphogenese, bei der Stabilisierung der Zellfortsätze und bei intrazellulären Transportvorgängen übernehmen (Johnson und Jope 1992, Tucker et al. 1988). Sie sind bereits von der frühen Entwicklung an bis hinein ins 2. Lebensjahr beim Menschen nachweisbar (Arnold und Trojanowski 1996, Viereck et al. 1988). Für die neuronale Plastizität und die Synaptogenese während des zerebralen Wachstums spielen sie eine wichtige Rolle (Gordon-Weeks 1993). Synaptophysin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Membranprotein präsynaptischer Vesikel (Rehm et al. 1986), welches in 95 % aller neokortikalen Synapsen des Hirns von Wirbeltieren vorkommt (Leclerc et al. 1989, Navone et al. 1986, Wiedenmann und Franke 1985) und als solches Aussagen zur Synapsendichte im Gewebe gestattet (Masliah et al. 1994).

Die Immunreaktivität von MAP1B und MAP2 war sowohl nach direkter fetaler Gabe bei Schaffeten (Schwab et al. 2001b) als auch nach maternaler Gabe der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung bei von Frühgeburt bedrohten Schwangeren verwendeten Betamethasondosis bei fetalen Primaten (Antonow-Schlorke et al. 2003) in zerebralem Kortex und Putamen vermindert. Zusätzlich war eine solche Minderung für MAP2 auch im Hippokampus zu beobachten. Veränderungen der MAP gelten als Hinweis auf frühzeitige strukturelle, intrazelluläre Störungen infolge neuronaler Schädigungen verschiedenster Genese (Bywood und Johnson 2000, Nassogne et al. 1995, Norberg und Zimmer 1998). Die Minderung der Immunreaktivität von Synaptophysin in Kortex, Putamen und Hippokampus nach fetaler Betamethasonbehandlung (Antonow-Schlorke et al. 2001) war, wie die Verluste der MAP, binnen 24 h reversibel (Colberg et al. 2004).

Unter physiologischen Bedingungen ist Kortisol sowohl prä- als auch postnatal an der Reifung der myelinproduzierenden Oligodendroglia und der Myelinisierung der Nervenfasern beteiligt (Barres et al. 1994, Gumbinas et al. 1973). Erhöhte fetale Glukokortikoidkonzentrationen, wie sie z. B. bei der antenatalen Gabe von Betamethason in der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung bei drohender Frühgeburt eingesetzten Dosis vorkommen, verzögern auch die zerebrale Myelinisierung beim fetalen Schaf (Helgert 2006,

Huang et al. 2001). Ähnlich den neuronalen Mikrotubulus-assoziierten Proteinen MAP1B und MAP2 verfügt das Myelin-Basisprotein (MBP), das ein Bestandteil der Myelinscheide ist und in der Arbeit von Helgert (2006) als immunhistochemischer Marker der Myelinisierung verwendet wurde, über Bindungsstellen für Tubulin und stabilisiert vermutlich zytoskelettale Elemente wie Aktin und Tubulin (Boggs 2006). Möglicherweise liegt in den funktionellen Ähnlichkeiten zwischen den neuronalen MAP und dem glialen MBP auch ein gemeinsamer Angriffspunkt für Glukokortikoide. Neben der Proliferationshemmung oligodendrozytärer Vorläuferzellen im Falle der Myelinisierungsstörungen (Alonso 2000, Barres et al. 1994, Bohn und Friedrich 1982), kommt für den Verlust von MAP, MBP und dem High-Turnover-Protein Synaptophysin auch ein Missverhältnis von Proteinsynthese und Proteindegradation in Frage, was so zu den gleichzeitig auftretenden Minderungen der Immunreaktivitäten von MAP1B, MAP2, MBP und Synaptophysin nach antenataler Betamethasonbehandlung führen könnte. Da sich die Abnahme des Gehaltes an High-Turnover-Proteinen nicht durch direkte Effekte auf die neuronale Erregbarkeit erklären lässt, müssen hier Effekte auf die Expression oder, weniger wahrscheinlich, auf den Abbau dieser Proteine vorliegen. Eine verminderte Expression ist am wahrscheinlichsten durch katabole Effekte der Glukokortikoide bedingt.

Die akute transiente Verminderung des Gehaltes zerebraler Strukturproteine trägt möglicherweise zu den oben genannten transienten Hirnfunktionsstörungen bei, die nach antenataler Gabe der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung bei drohender Frühgeburt eingesetzten Glukokortikoiddosen beim fetalen Schaf und Mensch beobachtet wurde (Schleussner et al. 2004, Schwab et al. 2001a). Für deren ursächliche Beteiligung an den beschriebenen Hirnfunktionsänderungen sprechen nicht nur der enge zeitliche und regionale Zusammenhang. Synaptophysin ist möglicherweise an der Freisetzung synaptischer Vesikel beteiligt (Thomas et al. 1988). Dessen Verlust kann auf diese Weise zu Störungen der synaptischen Übertragung und so zu den beobachteten fetalen ECoG- und Verhaltensänderungen führen. Eine gestörte neuronale und gliale Zytoskelettarchitektur, wie sie durch die MAP-Verluste und Myelinisierungsverzögerungen gezeigt wurde, nimmt möglicherweise auch Einfluss auf die Bildung neuronaler Erregungsmuster.

Weitere mögliche Ursachen für die Hirnfunktionsstörungen nach antenataler Glukokortikoidtherapie (Schwab et al. 2001a) sind direkte Glukokortikoideffekte auf die neuronale Erregbarkeit oder auf Transmittersysteme (Übersichten in Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994). So setzt Betamethason über die Aktivierung von Typ-II-Rezeptoren, die mit dem inhibitorisch wirksamen noradrenergen System interagieren,

wahrscheinlich die neuronale Erregbarkeit in der hippokampalen CA1-Region herab. Darüber hinaus gilt als sicher, dass Glukokortikoide auch nichtgenomisch über schnell wirksame Membranrezeptoren und über direkte Interaktion mit biologischen Membranen wirken (Duval et al. 1983, Falkenstein et al. 2000, McEwen 1991). Direkt oder über „second messenger“-Systeme können Glukokortikoide so innerhalb weniger Sekunden die Leitfähigkeit von Ionenkanälen ändern (Moore et al. 1995) und auf diese Weise zu Änderungen der neuronalen Erregbarkeit (Chen et al. 1991, Hua und Chen 1989) und einer Modulierung der synaptischen Funktion (Sze und Iqbal 1994) führen. Die genomische Aktivierung intrazellulärer Glukokortikoidrezeptoren dagegen bewirkt langsamere Änderungen der neuronalen Erregbarkeit, die jedoch schon innerhalb von 20 min zu Effekten führen (Joels und de Kloet 1992, McEwen 1994a, McEwen 1994b, Pfaff et al. 1971). Unabhängig vom Mechanismus zeigten die meisten *in vitro* Studien eine Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (Chen et al. 1991, Dafny et al. 1973, Hua und Chen 1989, Pfaff et al. 1971).

Die bedeutsamste Ursache für die Hirnfunktionsstörungen nach antenataler Glukokortikoidtherapie in einem möglicherweise multifaktoriellen System, d. h. im Zusammenspiel mit den eben diskutierten potentiellen Ursachen für die Hirnfunktionsstörungen nach antenataler Glukokortikoidtherapie (Schwab et al. 2001a) sind direkte Glukokortikoideffekte auf die neuronale Erregbarkeit oder auf Transmittersysteme (Übersichten in Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994). Ungefähr die Hälfte der aus dem zerebralen Glukose- und O<sub>2</sub>-Stoffwechsel gewonnenen Energie wird benötigt, um den Energiebedarf der Ionenpumpen, die den Ionengradienten über der Zellmembran aufrecht erhalten, zu decken (Erecinska und Silver 1989). Für die Zellfunktion und neuronale Erregbarkeit ist die Ionenpermeabilität der Zellmembran ein wesentlicher Faktor. Daher stellt ein zelluläres Energiedefizit in den betroffenen Regionen eine wichtige mögliche gemeinsame Ursache für die oben diskutierten Verluste von wesentlichen Strukturproteinen und die veränderte Hirnfunktion dar.

Ein zelluläres Energiedefizit kann direkt durch katabole Glukokortikoidwirkungen und einen gehemmten Energiestoffwechsel oder indirekt durch eine Minderung des zerebralen Blutflusses und damit der Nährstoffzufuhr verursacht sein. Inwiefern nun die nach Betamethasongabe zur gleichen Zeit beobachtete Abnahme der zerebralen Durchblutung in verschiedenen fetalen Hirnregionen für die Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (Schwab et al. 2001a) und die MAP- (Antonow-Schlorke et al. 2003, Schwab et al. 2001b) und Synaptophysinverluste (Antonow-Schlorke et al. 2001) von Bedeutung ist, bleibt fraglich

(Löhle et al. 2005, Schwab et al. 2000). Die Korrelation der Abnahme der zerebralen Durchblutung in den einzelnen Hirnregionen zu den MAP- und Synaptophysinverlusten war gering, so dass die Abnahme der neuronalen Erregbarkeit und die Verminderung des Gehaltes an wesentlichen Strukturproteinen wohl eher als direkte Effekte von Glukokortikoiden auf die Neuronen statt sekundäre Effekte infolge des verminderten zerebralen Blutflusses zu sehen sind. Zudem reicht eine Minderung der Hirndurchblutung um bis zu 40 %, wie sie nach direkter fetaler und mütterlicher Betamethasongabe beim Schaffeten nachgewiesen worden ist (Löhle et al. 2005, Reinhardt et al. 2007, Schwab et al. 2000), nicht aus, um die Änderungen der elektrokortikalen Aktivität zu erklären (Hossmann und Schuier 1980, Trojaborg und Boysen 1973). Dies lässt darauf schließen, dass die zerebralen Durchblutungs-minderungen nach antenataler Glukokortikoidtherapie allein nicht ausreichen um katabole Stoffwechseleffekte zu induzieren, und macht eine Beteiligung direkter kataboler Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Energiestoffwechsel wahrscheinlich.

Direkte katabole Effekte von Glukokortikoiden auf den neuronalen Energiestoffwechsel sind bekannt (Scully und Otten 1995). So wird die regionale Glukoseutilisation im Hirn adulter (Doyle et al. 1994) und neonataler (Tuor und Del Bigio 1996, Tuor et al. 1997) Ratten durch die Gabe synthetischer Glukokortikoide reduziert. Eine weitere theoretische Möglichkeit ist die Hemmung der Glukoseaufnahme in das Gehirn, wie es *in vitro* an neuronalen (Horner et al. 1990) und astrozytären (Virgin et al. 1991) Zellkulturen des Hippokampus des Rattenhirns gezeigt wurde. Die Glukoseaufnahme wird selektiv durch spezielle Glukosetransportproteine (GLUT) übernommen (Pardridge et al. 1990). Im Gehirn wird die Passage von Glukose über die Blut-Hirn-Schranke hinweg vom Glukosetransportprotein 1 (GLUT1) vermittelt (Pardridge et al. 1990). Die Kapazität des GLUT1 ist der limitierende Faktor für die Glukoseaufnahme in das Gehirn. Das Glukosetransportprotein 3 (GLUT3) kommt hauptsächlich in der neuronalen Zellmembran vor und vermittelt den Transport von Glukose in die Nervenzelle (Maher et al. 1992, Nagamatsu et al. 1993). Die immunhistochemische Untersuchung dieser beiden Glukosetransportproteine in den drei fetalen Hirnregionen frontaler Kortex, Putamen und Hippokampus zeigte jedoch weder für GLUT1 noch für GLUT3 eine Abnahme der Immunreaktivität nach direkter fetaler Exposition von Betamethason in klinischer Dosis am Schaf (Antonow-Schlorke et al. 2006). Wenn die zelluläre Zufuhr des für das Hirn wichtigsten Energielieferanten nicht behindert wird, liegt die Ursache möglicherweise in der Zelle auf Ebene der Verwertung der zugeführten Nährstoffe.

Zentraler Bestandteil des aeroben Metabolismus, in den bei hinreichender Oxygenierung des Gewebes sämtliche Stoffwechselprozesse mehr oder weniger vollständig münden, ist die mitochondriale Atmungskette.

#### ***1.2.4.2.3 Chronische zerebrale Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie***

Neben den akuten Effekten sind auch chronische Effekte auf die Hirnfunktion nachgewiesen. Wie bereits im Kap. 1.2.4.1.2 erörtert, können diesen chronischen Effekten zwei prinzipielle Mechanismen zugrunde liegen: zum einen finden sich programmierende Effekte auf die Hirnfunktion im späteren Leben, ohne dass strukturelle Abnormalitäten auftreten, zum anderen zeigt sich eine Modulierung der Hirnentwicklung, die bereits während der Entwicklung zur Ausprägung von klinischen Auffälligkeiten führen kann. Mit der fetalen Programmierung der Funktion der HHN-Achse (s. Kap. 1.2.4.1.2) sind postnatal motorische und kognitive Entwicklungs- und Verhaltensstörungen assoziiert (Derks et al. 1997, McMillen und Robinson 2005, Nyirenda und Seckl 1998, Schwab 2007, Welberg und Seckl 2001). Die enge Interaktion der HHN-Achse mit dem serotonergen System, d.h. die Hemmung des serotonergen Systems durch die Stressachse ist wahrscheinlich der prädisponierende Mechanismus neuropsychiatrischer Erkrankungen, wie Depressionen (Hanley und Van de Kar 2003, Huizink et al. 2004, Sloboda et al. 2005).

Ein Beispiel für die modulierenden Effekte der Glukokortikoide auf die Hirnentwicklung ist die Wachstumsretardierung bezüglich des Hirngewichts, wie bei neugeborenen Ratten (Carlos et al. 1992, Slotkin et al. 1992) und Schafen (Huang et al. 1999, Moss et al. 2005) gezeigt wurde. Sowohl im Tierexperiment (Moss et al. 2005, Pratt et al. 1999, Quinlivan et al. 1998, Sun et al. 1993) als auch beim Menschen (Banks et al. 1999, Bonanno et al. 2007, French et al. 1999) ließen sich parallel zu dieser Verzögerung wachstumsretardierende Effekte nachweisen, die den Gesamtorganismus betreffen. Das verminderte Hirnwachstum spiegelt sich in den bei Frühgeborenen gemessenen geringeren Kopfumfängen nach Lungenreifeinduktionstherapie mit antenatalen Glukokortikoiden wider (Abbasi et al. 2000, Banks et al. 1999, Bonanno et al. 2007, French et al. 1999). Folgeuntersuchungen der Kopfgröße bei Geburt wiesen diese als wichtigen prädiktiven Faktor für die kognitiven Fähigkeiten der Kinder im Schulalter aus (Hack et al. 1991). Die allgemeine und zerebrale Minderung des Wachstums ist wahrscheinlich eine Folge der Hemmung der Proliferation der Zellen durch Glukokortikoide zugunsten einer Zelldifferenzierung (Brodhun et al. 2003, Brodhun et al. 2004), ein Effekt, der sich bei der Induktion der Lungenreifung zunutze



gemacht wird (Sloboda et al. 2005, Weinstock 2001, Welberg und Seckl 2001). Die Förderung der Differenzierung zu Ungunsten einer Proliferation bewirkt auch leichte Störungen bei der Entwicklung der Hirnfunktion. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die glukokortikoidinduzierte Beschleunigung der zerebralen Reifung spezifische Transmittersysteme wie das cholinerge und das serotonerge System betrifft, womit das Gleichgewicht der Reifung verschiedener neuronaler Systeme gestört wird und es damit zu Funktionsstörungen kommt (Schwab et al. 2006b).

Im Hippokampus der fetalen und adulten Ratten- und Primatengehirne konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass antenatale Glukokortikoide zu einer Dendritendegeneration und irreversiblen Verminderung der Neuronenzahl führen (Sapolsky et al. 1990, Scully und Otten 1995, Uno et al. 1994). Dabei spielt möglicherweise ein durch katabole Glukokortikoideffekte hervorgerufenen, zelluläres Energiedefizit, welches zu einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zelle und in Verbindung mit weiteren Faktoren auch zur Apoptose führt, eine Rolle (Scully und Otten 1995). Für die Regulation der Apoptose ist die Mitochondrienfunktion ein wichtiger Aspekt. Neben der Energieproduktion durch oxidative Phosphorylierung und dem damit verbundenen indirekten Einfluss auf die Regulation der Apoptose sind Teile der Atmungskette auch unmittelbar an der Induktion der Apoptose beteiligt (s. Kap. 1.3.2.6).

### **1.3 DIE ROLLE DER MITOCHONDRIEN IM ENERGIESTOFFWECHSEL DER ZELLE**

#### **1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien**

Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen von komplexer Struktur und Funktion, die in unterschiedlicher Anzahl in allen eukaryonten Zellen, außer in Erythrozyten, vorkommen. Phylogenetisch entsprechen sie inkorporierten, Sauerstoff reduzierenden Proteobakterien, die es den unter zunehmendem Sauerstoffstress der sich wandelnden Erdatmosphäre leidenden Archetypen der Eukaryonten ermöglichten, die intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen auf ungiftige Werte zu senken (Gray et al. 1999). In der allmählichen Entwicklung von zelleigenen Bakterien zu Mitochondrien wurde praktisch das gesamte bakterielle Genom in den Kern integriert (Gray 1993).

Wahrscheinlich als Relikt ihres evolutionären Ursprungs sind die Mitochondrien von zwei Membranen umgeben, die mehrere funktionelle Kompartimente definieren. Die so gebildeten Räume unterscheiden sich in ihrer Enzymausstattung (Löffler und Petrides 1998). Spezielle Transportsysteme ermöglichen den kontrollierten Stoffaustausch zwischen

Mitochondrienmatrix und Zytosol über die Membranen hinweg, auch gegen ein Konzentrationsgefälle (Kuan und Saier 1993). Auf diese Weise sind die Mitochondrien an die vielen verschiedenen Aufgaben, die sie im Stoffwechsel und in zahlreichen anderen, für das Überleben der Zelle wichtigen Funktionen übernehmen, hervorragend angepasst:

Die **äußere Mitochondrienmembran** markiert die Grenze zum Zytosol, ist mit ihren Porinporen aber für kleine Moleküle ( $< 8$  kDa) frei durchlässig (Zalman et al. 1980). Die effektive Porenöffnung beträgt jedoch nur 1 % der Membranoberfläche, so dass es bei Diffusion der Moleküle zu einem messbaren Diffusionsgradienten über der Außenmembran kommt (Gellerich et al. 1994). Außerdem enthält sie Enzyme der Lipidsynthese und des Proteinimports.

In der **inneren Mitochondrienmembran** sind die Multienzymkomplexe der Atmungskette lokalisiert, welche die Elektronen der aus katabolen Stoffwechselwegen stammenden Reduktionsäquivalente schrittweise auf den Sauerstoff übertragen (Hatefi 1985). Der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung (s. Kap. 1.3.2) erfordert es, dass die Innenmembran selbst für Protonen impermeabel ist. Nur sehr kleine, ungeladene Moleküle wie  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  können ungehindert passieren. Für den Transport von Substraten und Metaboliten sind hochspezifische Translokatoren eingelagert. Auch die für den programmierten Zelltod (Apoptose) bedeutsame Permeability Transition Pore (PTP), die bei reversibler Öffnung  $\text{Ca}^{2+}$  hinauslässt und bei irreversibler Öffnung zur Mitoptose führt, ist hier lokalisiert (Bernardi et al. 1994, Halestrap et al. 1998, Pastorino et al. 1994).

Der zwischen den beiden Membranen angesiedelte **Intermembranraum** beherbergt neben Cytochrom c, einem wasserlöslichen elektronenübertragenden Koenzym der Atmungskette, auch die Adenylat-Kinase, die unter ATP-Verbrauch im anabolen Stoffwechsel entstandenes AMP in ADP über- und der oxidativen Phosphorylierung zuführt. Der Intermembranraum setzt sich bis in die sog. Cristae und Tubuli fort, die durch Faltung und Doppellage der Innenmembran entstehen (Frey und Mannella 2000). Bei der oxidativen Phosphorylierung dient er als Reservoir für die von den Atmungskettenenzymen aus der Matrix transportierten Protonen. So wird ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran geschaffen, der die nötige Energie für den Antrieb der in der inneren Mitochondrienmembran eingelagerten  $\text{F}_1/\text{F}_0$ -ATP-Synthase liefert.

In der **Matrix**, dem Inneren der Mitochondrien, findet die Endoxidation der Nährstoffe statt. Die gemeinsame Endstrecke von Glykolyse,  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und Abbau der Aminosäuren bildet der Citratzyklus, dessen Enzyme vollständig in der Mitochondrienmatrix

lokalisiert sind. Daneben finden sich mehrere Hundert Proteine verschiedener anderer Enzymsysteme, wie der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Enzyme der  $\beta$ -Oxidation oder des Harnstoff- und Ketonkörperzyklus in der Leber, sowie RNA- und DNA-Polymerasen, Peptidasen und Stressproteine für das Processing, Sorting und Assembling der importierten, im Zytosol synthetisierten Proteine in der mitochondrialen Matrix (Scheffler 2001).

Mitochondrien verfügen über ein eigenes Genom, ein weiterer Hinweis auf ihren bakteriellen Ursprung. Die doppelsträngige, ringförmige mt-DNA besteht aus lediglich 16500 Basenpaaren und liegt frei in der Matrix. Ihre Sequenz ist seit 1981 vollständig bekannt (Anderson et al. 1981). Ihre Gene enkodieren für zwei ribosomale und 22 Transfer-RNA-Abschnitte des mitochondrialen Proteinsyntheseapparates sowie für 13 Polypeptide, welche Teile der Elektronentransportkette sind (Wallace 1982). Die mt-DNA enthält anders als das nukleäre Genom keine Introns. In jedem Mitochondrium gibt es mehrere Kopien der mt-DNA, so dass in jeder Zelle mehrere hundert Kopien existieren. Allerdings werden die Enzyme der Replikation, Transkription, Translation und Reparatur des mitochondrialen Biosyntheseapparates durch nukleäre Gene auf der n-DNA enkodiert (Taanman 1999).

Im Mittelpunkt der Untersuchungen von Mitochondrien steht immer wieder und allem voran ihre Rolle als „Kraftwerke“ der Zelle. Jenseits von Zellatmung, oxidativer Phosphorylierung und Produktion von ATP (s. Kap. 1.3.2), das als „Energiewährung“ des Zellstoffwechsels für alle wichtigen Reaktionen - wie die Muskelkontraktion oder die Biosynthese von Zellbausteinen - und für den Erhalt der zellulären Integrität benötigt wird, übernehmen sie noch viele weitere Aufgaben:

Dass wichtige Schritte des katabolen Stoffwechsels wie der Citratzyklus oder die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, in den Mitochondrien ablaufen fand bereits Erwähnung. Aber auch die Synthese von Häm, Lipiden, Aminosäuren und Nukleotiden sowie der Erhalt der intrazellulären Homöostase von anorganischen Ionen, obliegt ihrer intakten Funktion (Schatz 1995).

Gerade mal ein gutes Dutzend der mehr als 1000 mitochondrialen Polypeptide wird in den Mitochondrien synthetisiert. Ihre Biogenese ist vollständig von auf der n-DNA kodierten und anschließend aus dem Zytosol importierten Proteinen abhängig (Attardi und Schatz 1988). Eine Mutation von für den Import verantwortlichen Transportproteinen (Hannavy et al. 1993, Schatz 1992, Segui-Real et al. 1992). führt aufgrund der zahlreichen beeinträchtigten mitochondrialen Funktionen umgekehrt auch zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen der gesamten Zellfunktion (Yaffe und Schatz 1984).

Mitochondrien sichern nicht nur das Überleben der Zelle. Für Wachstum und Differenzierung von Geweben ist auch der kontrollierte Zelltod durch Apoptose eine essentielle Zellfunktion, in der Mitochondrien eine regulierende Position einnehmen (Green und Reed 1998, Susin et al. 1998); (s. Kap. 1.3.2.6).

Genau wie bei der Regulation der Apoptose spielt auch bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) das System der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle, da die Hemmung der Elektronentransportkette die Generierung von Radikalen begünstigt (Wallace 1999); (s. Kap.1.3.2.5).

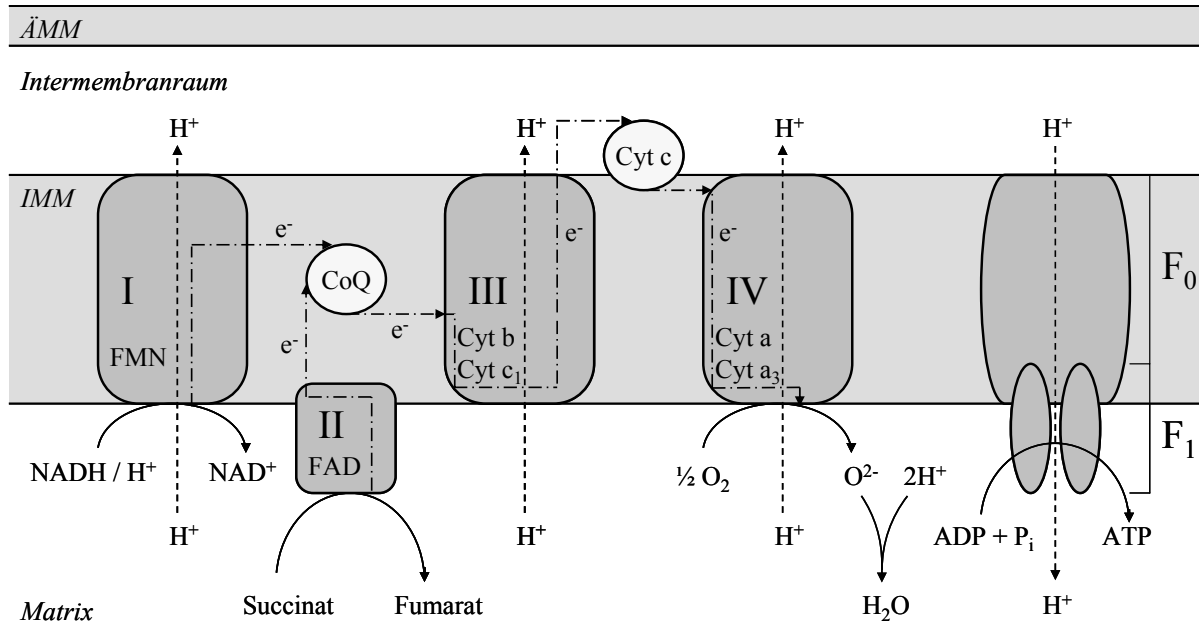
## **1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung**

### **1.3.2.1 Prinzip der oxidativen Phosphorylierung**

Der Großteil der für die Zellfunktionen in aeroben Geweben benötigten Energie stammt aus der Zellatmung, bei der die Abbauprodukte aus dem katabolen Stoffwechsel der zugeführten Nährstoffe schließlich zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert werden (Löffler und Petrides 1998). Sie wird in den Mitochondrien durch das System der oxidativen Phosphorylierung realisiert, welches die Energie aus dem Abbau der organischen Verbindungen in Form von ATP zwischenspeichert und der Zelle zur Verfügung stellt.

Die Kompartimentierung der Mitochondrien in Matrix und Intermembranraum durch die innere Mitochondrienmembran und deren Integrität schaffen die Voraussetzungen für das zugrunde liegende Prinzip der oxidativen Phosphorylierung (Babcock und Wikström 1992):

Über vier in der inneren Mitochondrienmembran eingelagerte Multienzymkomplexe erfolgt die schrittweise Übertragung von Elektronen, die aus der Reoxidation der wasserstoffübertragenden Koenzyme des Citratzyklus und des Intermediärstoffwechsels stammen, auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Die Kontrolle und die Verteilung der stark exergonischen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser auf mehrere Teilschritte durch die Atmungskette erlaubt es den Komplexen I, III und IV, die freigewordene Energie nutzbar zu machen, indem sie Protonen aus dem Innenraum der Mitochondrien in den Intermembranraum pumpen (Hatefi 1985); (s. Abb. 1). Der über der für Protonen impermeablen inneren Mitochondrienmembran entstehende elektrochemische Gradient führt zum Rückstrom von Protonen in die Matrix durch den  $\text{F}_0$ -Teil der ATP-Synthase (auch als Komplex V bezeichnet) und treibt deren  $\text{F}_1$ -Teil an. Dieser katalysiert die Phosphorylierung von ADP und regeneriert so das von der Zelle verbrauchte ATP (Saraste 1999).



**Abb. 1:** Das System der oxidativen Phosphorylierung

Schematische Darstellung der vier Komplexe der Elektronentransportkette (I – IV) und der  $F_1/F_0$ -ATP-Synthase in der inneren Mitochondrienmembran (Ausschnitt).

Dargestellt sind der Elektronenfluss durch die Atmungskette und die daran beteiligten prosthetischen Gruppen (Cyt  $a/a_3/b/c/c_1$  = Cytochrom  $a/a_3/b/c/c_1$ , CoQ = Coenzym Q, FMN = Flavinmononukleotid, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid), die Protonenflussrichtung an den Protonenpumpen und der ATP-Synthase, die Oxidation von NADH und Succinat und die Reduktion von molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasser, die Phosphorylierung von ADP zu ATP sowie die Beteiligung der Kompartimente äußere Mitochondrienmembran (ÄMM), Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran (IMM) und Matrix an diesen Prozessen.

### 1.3.2.2 Die Enzymkomplexe der Atmungskette

Der Elektronentransfer wird durch verschiedene prosthetische Gruppen realisiert, zu denen Eisen-Schwefel-Zentren, Häm-Gruppen vom Typ  $a$ ,  $b$  und  $c$ , Flavine (FMN, FAD, Chinon) sowie Kupferzentren zählen. Sie sind in den Untereinheiten der vier Komplexe sowie in den beiden mobilen Elektronenüberträgern Ubichinon und Cytochrom  $c$  organisiert und bilden zusammen die Atmungskette (Boekema und Braun 2007):

#### 1.3.2.2.1 Komplex I: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase

Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) ist der größte der Atmungskettenkomplexe. Von den mehr als 40 Untereinheiten werden sieben durch die mt-DNA kodiert. Die zentralen Untereinheiten katalysieren die Oxidation des hauptsächlich aus dem Citratzyklus und dem intermediären Stoffwechsel stammenden NADH (Janssen et al. 2006, Lenaz et al. 2006). Die Elektronen aus dieser Reaktion werden auf das Ubichinon (oder Coenzym Q)

transferiert, welches durch die Reduktion zum Ubihydrochinon wird. Die freiwerdende Energie wird zum Transport von vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt.

#### **1.3.2.2.2 *Komplex II: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase***

Auch die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II) überträgt die aus der Oxidation von Succinat zu Fumarat hervorgehenden Elektronen auf das Ubichinon. Die beiden hydrophilen Untereinheiten des nur aus vier, ausschließlich nukleär kodierten, Untereinheiten bestehenden Komplexes entsprechen der Succinat-Dehydrogenase (SDH) des Citratzyklus (Horsefield et al. 2004). Diese enthält das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), welches statt NADH als wasserstoffübertragendes Koenzym  $\text{FADH}_2$  fungiert. Die so gewonnene Energie ist zu gering, um eine Protonenpumpe anzutreiben. Sie führt der Atmungskette lediglich weitere Elektronen aus dem Citratzyklus zu (Hägerhäll 1997).

#### **1.3.2.2.3 *Komplex III: Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase***

An der Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) werden die vorher zugeführten Elektronen von Ubihydrochinon auf Cytochrom c übertragen. Durch die Reoxidation steht Ubichinon den Komplexen I und II als Elektronenakzeptor wieder zur Verfügung. Effektiv werden dabei zwei Protonen durch den Komplex III in den Intermembranraum transportiert. Von elf Untereinheiten bilden drei den katalytischen Kern. Das Cytochrom b ist der einzige Teil, der durch das mitochondriale Genom kodiert wird (Rich 2003).

#### **1.3.2.2.4 *Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase (COX)***

Der letzte Schritt in der Atmungskette ist der Elektronentransfer von reduziertem Cytochrom c auf Sauerstoff durch die COX (Komplex IV) unter Bildung von Wasser (Capaldi 1990a). Von den 13 Untereinheiten dieses Komplexes bilden drei mitochondrial kodierte Polypeptide das katalytische Zentrum (Stiburek et al. 2006). Formal ist durch den Auswärtstransport von zwei Protonen und die Aufnahme zwei weiterer Protonen aus dem Matrixraum zur Wasserbildung durch den Komplex IV die Translokation von vier Ladungen an die Reduktion jedes Sauerstoffatoms gekoppelt (Saraste 1999).

Insgesamt werden durch die Komplexe I, III, und IV pro oxidiertem NADH also 10 Protonen aus der Matrix gepumpt. Da bei der Einschleusung von Elektronen über den Komplex II der

Komplex I umgangen wird, tragen bei der Oxidation von Succinat nur Komplex III und IV mit 6 Protonen zur Ausbildung des elektrochemischen Gradienten bei. Das dabei über der inneren Mitochondrienmembran entstehende Membranpotential führt zum Rückstrom von Protonen durch den ATP-synthetisierenden  $F_1/F_0$ -ATP-Synthase-Komplex in die Mitochondrienmatrix.

### **1.3.2.3 Der $F_1/F_0$ -ATP-Synthase-Komplex**

Die  $F_1/F_0$ -ATP-Synthase wird auch als Komplex V des Systems der oxidativen Phosphorylierung bezeichnet, beteiligt sich aber nicht am Elektronentransport und gehört damit nicht zur Atmungskette im eigentlichen Sinne. Genauso wie deren Enzymkomplexe ist die Synthase in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Zwei der mehr als 15 Untereinheiten sind mitochondrial kodiert (Lutter et al. 1993). Die von der Atmungskette in den Intermembranraum gepumpten Protonen folgen dem so entstandenen elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran durch den  $F_0$ -Teil zurück in die Matrix. Der Rückstrom treibt den in die Matrix hineinreichenden  $F_1$ -Teil der Synthase an, der die Phosphorylierung von ADP zu ATP katalysiert (Elston et al. 1998). Über diesen Protonengradienten sind die Substratoxidation an der Atmungskette und die Phosphorylierung von ADP an der ATP-Synthase eng aneinander gekoppelt (Mitchell 1961).

Das entstehende ATP wird vom Adeninnukleotid-Translokator (AnT) der inneren Mitochondrienmembran im Eins-zu-eins-Austausch gegen ADP, welches durch ATP-verbrauchende Prozesse entstanden ist, ins Zytosol transportiert (Nury et al. 2006).

### **1.3.2.4 Bedeutung des Systems der oxidativen Phosphorylierung im zellulären Energiestoffwechsel für die neuronale Zellfunktion**

Die zweifelsohne wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die ATP-Produktion durch das System der oxidativen Phosphorylierung. Bei der Hydrolyse der energiereichen Verbindung ATP in die energieärmeren Verbindungen ADP, AMP und anorganisches Phosphat wird Energie frei, die von der Zelle für alle wichtigen Reaktionen, wie Muskelkontraktion oder Biosynthese von Zellbausteinen, und den Erhalt der zellulären Integrität benötigt wird. Das auf diese Weise verbrauchte ATP wird je nach Zellart und Funktionszustand zu einem Großteil durch den aeroben Stoffwechsel regeneriert, dessen zentraler Bestandteil das System der oxidativen Phosphorylierung ist. Ist das System der oxidativen Phosphorylierung in seiner Funktion eingeschränkt und sind Kompensationsmechanismen wie die Steigerung der

anaeroben glykolytischen ATP-Synthese erschöpft, führt dies zur energetischen Depression der Zelle. Durch verminderte Phosphorylierungspotentiale und gestörtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling wird die Fähigkeit der Zelle zu normaler Zellarbeit vermindert.

Ungefähr die Hälfte der aus dem zerebralen Glukose- und  $\text{O}_2$ -Stoffwechsel gewonnenen Energie wird allein dafür benötigt, den Energiebedarf der Ionenpumpen, die den Ionengradienten über der Zellmembran aufrecht erhalten, zu decken. Da dieser für die Entstehung und Übertragung neuronaler Aktionspotentiale von essentieller Bedeutung ist (Erecinska und Silver 1989), hängt die neuronale Funktion und Aktivität in entscheidender Weise von der Funktionalität des Systems der oxidativen Phosphorylierung ab.

### **1.3.2.5 Die Rolle des Systems der oxidativen Phosphorylierung bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)**

Das System der oxidativen Phosphorylierung ist eine wichtige endogene Quelle für die sog. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies sind toxische Zwischenprodukte der Atmung, zu denen laut Definition das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) zählen. Sie können nahezu alle Arten von Biomolekülen angreifen und funktionell schwer beeinträchtigen. So induzieren sie Strangbrüche der DNA, Veränderungen der Raumstruktur von Proteinen sowie Modifikationen von Kohlenhydraten und Lipiden (Löffler und Petrides 1998).

Die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidradikal  $\text{O}_2^{\bullet-}$  kann physikalisch durch UV-Licht, Röntgen- oder Gammastrahlen induziert werden, aber auch durch Autoxidation reduzierter Zwischenprodukte des Stoffwechsels erfolgen. Zu den grundsätzlich autoxidablen Zwischenprodukten zählt neben Flavinen, Thiolen, Hämoglobin und anderen Komplexen von Übergangsmetallen auch das in der mitochondrialen Atmungskette gebildete Ubisemichinon. Bei einer Hemmung der Atmungskette akkumulieren Elektronen bereits auf den frühen Stufen von Komplex I und Ubichinon, was zur direkten Übertragung auf molekularen Sauerstoff und zu vermehrter Bildung von Superoxidradikalen führen kann (Pitkanen und Robinson 1996). Die Superoxid-Dismutase wandelt zwei Superoxid-Moleküle in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Dieses ist zwar selbst weniger aggressiv, kann jedoch wiederum durch Übertragung eines dritten Elektrons in ein Hydroxyl-Ion und das äußerst reaktive Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) gespalten werden.



Die genauen Mechanismen sowie die physiologischen und pathologischen Zustände die tatsächlich zu einer vermehrten Superoxidbildung führen sind derzeit in der Diskussion. Prinzipiell sind unter experimentellen Bedingungen mehrere möglich Bildungsplätze in der Atmungskette beschrieben worden, dennoch scheint *in vivo* außer Komplex III v. a. Komplex I im Vordergrund zu stehen. Besonders unter extremen Stoffwechselbedingungen und bei vorgeschädigten Atmungskettenkomplexen könnten so vermehrt Superoxide entstehen (Adam-Vizi und Chinopoulos 2006).

#### **1.3.2.6 Die Rolle des Systems der oxidativen Phosphorylierung in der Apoptose**

Mitochondrien sind maßgeblich an der Initiation der Apoptose beteiligt (Green und Reed 1998, Petit et al. 1996). Das Öffnen der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Permeability Transition Pore (Marzo et al. 1998, Zoratti und Szabo 1995) führt zum Zusammenbruch des Membranpotentials, zur Schwellung der Matrix und damit zur Ruptur der Außenmembran und Freisetzung Apoptose-vermittelnder Faktoren aus dem Intermembranraum:

Cytochrom c aktiviert die zytosolische Deproteinisierung durch die Caspasen und setzt so die Fragmentierung des Zytoplasmas in Gang (Bossy-Wetzel und Green 1999, Cai et al. 1998, Halestrap et al. 2000, Liu et al. 1996), der Apoptose-induzierende Faktor (AIF, ein Flavoprotein) induziert die Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung im Zellkern (Susin et al. 1999).

Sowohl der exzessive Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ , die Exposition mit reaktiven Sauerstoffspezies als auch eine verminderte energetische Kapazität kann zur Öffnung der Permeability Transition Pore und damit zum programmierten Zelltod führen. Eine deutliche Minderung der mitochondrialen Energieproduktion und chronischer oxidativer Stress können also zur Apoptose-Induktion beitragen (Green und Reed 1998, Liu et al. 1996, Susin et al. 1999, Zoratti und Szabo 1995).

### **1.4 STÖRUNGEN DER MITOCHONDRIENFUNKTION DURCH GLUKOKORTIKOIDE**

#### **1.4.1 Mechanismen der Glukokortikoidwirkung auf die Mitochondrienfunktion**

Außer hereditären, meist chronischen Störungen treten akute Störungen der Mitochondrienfunktion unterschiedlichster Genese auf.

So können Mitochondrien in ihrer Funktion auch durch Steroidhormone, wie Glukokortikoide (Gavrilova-Jordan und Price 2007), und durch andere Medikamente vieler verschiedener Wirkstoffgruppen (Szewczyk und Wojtczak 2002, Youssef und Badr 1992) sowie durch Toxine (Alston et al. 1977, Phelka et al. 2003) beeinträchtigt werden.

Die Wirkungen von Glukokortikoiden auf die Funktionen der Mitochondrien und der oxidativen Phosphorylierung sind durch die Vielzahl und Komplexität der derzeit diskutierten Wirkmechanismen und deren Interaktionen vielfältig und sehr variabel. Dabei wird zwischen genomisch und nichtgenomisch vermittelten Glukokortikoidwirkungen unterschieden. Da Mitochondrien über ein eigenes Genom verfügen (s.Kap. 1.3.1), können die genomisch vermittelten Glukokortikoidwirkungen auf die Mitochondrien weiter in nukleärogenomisch vermittelte und mitochondrialgenomisch vermittelte Wirkungen unterteilt werden.

#### **1.4.1.1 Nukleärogenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen**

Glukokortikoide können als Steroide die lipophile Barriere der Zellmembran ungehindert passieren und an spezifische Glukokortikoidrezeptoren (GR) binden. Sie gehören wie alle Steroidhormonrezeptoren, die Rezeptoren für Vitamin D, Retinol und Schilddrüsenhormon sowie die Klasse der Orphanrezeptoren zur Supergenfamilie der „nukleären Hormonrezeptoren“. Die Aktivierung nukleärer Rezeptoren führt zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle und zur Freilegung einer „nukleären Lokalisierungssequenz“ (Tsai und O'Malley 1994). Dies ist der klassische auch für Glukokortikoide bekannte Wirkmechanismus. Der ligandengebundene Glukokortikoidrezeptor kann nach gerichtetem Transport in den Zellkern an seine spezifische Promotorbindungsstelle, das „Glukokortikoid-responsive Element (GRE)“ der n-DNA, binden und als Transkriptionsfaktor wirken (Beato et al. 1996). Außer einer Induktion der Proteinsynthese durch Aktivierung der Transkription korrespondierender Gene („Transaktivierung“) ist auch eine Hemmung der Transkription möglich. Nur ein sehr geringer Teil der über den GR regulierten Gene weisen ein für eine direkte Transkriptionshemmung notwendiges, „negatives Glukokortikoid-responsives Element (nGRE)“ auf. Häufiger ist die indirekte Hemmung durch „Transrepression“, bei der die Interaktion des aktivierten Rezeptors mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren (Göttlicher et al. 1998, Klein-Hitpass et al. 1998) zu einer Änderung der Transkriptions- und letzten Endes auch der Proteinsyntheserate führt (Bamberger und Schulte 1997). Dies gilt besonders für die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Glukokortikoidwirkungen (Auphan et al. 1995, Barnes 1998, McKay und Cidlowski 1999).

Glukokortikoid-vermittelte Aktivierung oder Hemmung der Transkription von Genen der n-DNA, die für mitochondriale Proteine kodieren, können so sekundär die Mitochondrienfunktion modulieren.

#### **1.4.1.2 Mitochondrialgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen**

In den letzten zwei Jahrzehnten sind Mitochondrien als primäre Wirkorte für Glukokortikoide verstärkt untersucht worden. So sind in mehreren Studien intramitochondrial lokalisierte Glukokortikoidrezeptoren in verschiedenen Tierzelllinien nachgewiesen worden (Demonacos et al. 1993, Koufali et al. 2003, Psarra et al. 2003, Scheller et al. 2003). Auch in isolierten Mitochondrien aus dem Kortex und dem Hippokampus des Rattenhirns ist der Nachweis eines solchen Rezeptortyps gelungen (Moutsatsou et al. 2001). Zudem sind mitochondriale Nukleotidsequenzen mit Charakteristika von Glukokortikoid-responsiven Elementen und Promotorfunktion für Gene der Untereinheit I der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), für die Untereinheiten I und III der COX (COX, Komplex IV) und für Gene des mitochondrialen Proteinsyntheseapparates identifiziert und die spezifische Bindung der mitochondrialen GR an diese gezeigt worden (Demonacos et al. 1995, Demonacos et al. 1993, Demonacos et al. 1996, Ioannou et al. 1988, Tsiriyotis et al. 1997). Die wichtigsten Voraussetzungen für mögliche genomische Glukokortikoidwirkungen über die Regulation mitochondrial lokalisierter Gene sind damit gegeben.

Tatsächlich sind Effekte von Glukokortikoiden auf den zellulären Energiestoffwechsel über die Regulation von nukleären und mitochondrialen Genen, die für die Enzyme des Systems der oxidativen Phosphorylierung kodieren, bekannt (Van Itallie 1990, Weber et al. 2002). Die bisher beobachteten genomisch vermittelten Wirkungen sind offenbar gewebespezifisch. So kam es nach Weber et al. (2002) durch Dexamethason zur Stimulation der mitochondrialen Biogenese mit Verdopplung der COX-Aktivität und zu einer Erhöhung der ATP-Ausbeute speziell im Skelettmuskelgewebe, während solche Effekte in Kolon, Leber oder Niere ausblieben.

#### **1.4.1.3 Nichtgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen**

Während die genomisch vermittelten Wirkungen von Glukokortikoiden durch eine Latenzzeit von mehreren Stunden charakterisiert sind, treten viele Wirkungen von Glukokortikoiden jedoch schon innerhalb von Minuten auf und können nicht durch die oben beschriebenen transkriptionellen Wirkmechanismen erklärt werden. Für diese werden nichtgenomische

„unspezifische“ Effekte durch Wechselwirkung mit biologischen Membranen und nichtgenomische „spezifische“ Wirkungen über membranständige Rezeptoren diskutiert (Buttgereit 2000, Falkenstein et al. 2000).

Auch für den Einfluss von Glukokortikoiden auf die Funktion der Mitochondrien kommen nichtgenomische Wirkungen in Betracht. Die unspezifische Wechselwirkung von Glukokortikoiden mit der inneren Mitochondrienmembran hätte besonders für das dort lokalisierte System der oxidativen Phosphorylierung Bedeutung. Im Lebergewebe von Ratten zeigten mehrere Studien eine akute Minderung der Atmungs- und ATP-Syntheserate nach Glukokortikoidgabe (Dumas et al. 2003, Jani et al. 1991, Roussel et al. 2004). Jani et al. (1991) beobachteten eine solche entkoppelnde Wirkung nicht nur nach chronischer, sondern auch nach akuter Kortikosterongabe und stellten die Hypothese zweier verschiedener Wirkmechanismen für akute und chronische Wirkung auf, da für die kurzfristigen Wirkungen die Zeitspanne für mögliche genomische Effekte zu gering war. Der Energiestoffwechsel von Lymphozyten wird durch eine Hochdosistherapie mit Methylprednisolon wohl auch durch nichtgenomische unspezifische Membraneffekte gehemmt (Buttgereit et al. 2000).

#### **1.4.2 Spezifische Glukokortikoideffekte auf die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe**

Spezifische Effekte von Glukokortikoiden auf einzelne Enzymkomplexe der Atmungskette sind bisher für Nieren- und Hirngewebe beschrieben. So kam es *in vitro* an isolierten Mitochondrien der Niere (Simon et al. 1998) und des Hirns (Morin et al. 2000) von Ratten durch Zusatz verschiedener Glukokortikoide nicht nur zu einer generellen Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und mitochondrialen Atmung. Beide Studien zeigten für Dexamethason auch spezifische hemmende Effekte auf die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) (Morin et al. 2000) bzw. die COX (Komplex IV) (Simon et al. 1998). Beide Enzyme kommen somit als Ziel der Wirkung zumindest von synthetischen Glukokortikoiden, wie Dexamethason oder Betamethason, die bei der Lungenreifeinduktionstherapie bei drohender Frühgeburt antenatal zur Anwendung kommen, in Betracht.

Die chronische Kortikosterongabe führte bei Ratten zu einer Verstärkung der COX-hemmenden Effekte von Aziden im Hirn und zu einer Verstärkung des so modellierten Lerndefizits (Bennett et al. 1996). Ansonsten ist nach unserem Kenntnisstand *in vivo* ein

solcher, direkter Einfluss auf die Aktivität von Enzymkomplexen der Atmungskette im Hirngewebe bisher noch nicht gezeigt worden.

Zusammen ergibt dies das Bild einer sehr komplexen und feinen Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch Glukokortikoide und andere Steroidhormone. Das Hirn ist, als eines der Organe mit dem höchsten Energiebedarf, von einer solchen Regulation durch Glukokortikoide in der Anpassung an das Energieangebot in besonderer Weise abhängig. Vieles deutet darauf hin, dass das System der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien einer der Hauptangriffspunkte der Energiestoffwechselregulation durch Glukokortikoide ist.

## 2 ZIELE DER ARBEIT

Die antenatale Glukokortikoidtherapie zur Induktion der fetalen Lungenreifung hat durch die Senkung der Inzidenzen von kindlichem Atemnotsyndrom, intraventrikulären Hirnblutungen und nekrotisierender Enterokolitis maßgeblich zur Senkung der neonatalen Mortalität beigetragen (Kap. 1.1). Studien der letzten Jahre zeigten allerdings zunehmend kardiale, vaskuläre, metabolische und zerebrale Nebenwirkungen der antenatalen Glukokortikoidgabe. Aus Untersuchungen am fetalen Schaf, dem Tiermodell, an welchem die antenatale Glukokortikoidtherapie entwickelt worden ist, sind u. a. akute zerebrale Nebenwirkungen von Betamethason in klinischer Dosierung auf die elektrokortikale Hirnfunktion und auf den Gehalt wesentlicher zerebraler Strukturproteine bekannt (Kap. 1.2.4.2.2).

Eine Ursache dieser Effekte ist wahrscheinlich der durch katabole Effekte von Glukokortikoiden gehemmte zerebrale Energiestoffwechsel. Dieser kann über die Beeinträchtigung des neuronalen Membranpotentials, über die verminderte Proteinexpression und über die Abnahme der Hirndurchblutung (durch die Kopplung von Metabolismus und Hirndurchblutung) zu der veränderten elektrischen Hirnfunktion führen.

Mögliche Mechanismen der katabolen Effekte von Glukokortikoiden sind z. B. die Hemmung der Glukosezufuhr oder die Hemmung der Glukose-verwertenden Stoffwechselwege. Eine Hemmung der Glukoseaufnahme in das Gehirn durch Betamethason in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis konnte durch unsere Arbeitsgruppe als Ursache für mögliche katabole Effekte beim fetalen Schaf ausgeschlossen werden (Kap. 1.2.4.2.2). Da der bedeutendste Schritt bei der Energiegewinnung im aeroben Stoffwechsel durch die oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette erfolgt, vermuteten wir hemmende Wirkungen von Glukokortikoiden auf die Enzymkomplexe der Atmungskette.

Trotz der erheblichen Nebenwirkungen sind nie Dosis-Wirkungs-Untersuchungen - nicht einmal im Rahmen der klinischen Zulassung dieser Therapie vor 30 Jahren - durchgeführt worden. Es gibt Hinweise darauf, dass die klinisch verwendete Dosis supramaximal ist. Beispielsweise führt die antenatale Betamethasontherapie dosisunabhängig zu einer Erhöhung des fetalen Blutdruckes auch in Dosierungen, die weit unter der klinisch verwendeten liegen (Schwab et al. 2006a).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, den Einfluss einer antenatalen Glukokortikoidtherapie in klinischer Dosis auf die Funktion der mitochondrialen

Atmungskette und die mitochondriale ATP-Produktion im fetalen Hirngewebe des fetalen Schafes zu untersuchen. Dabei sollten folgende Arbeitshypothesen getestet werden:

1. Betamethason bewirkt akute Funktionsstörungen der mitochondrialen Atmungskette.
2. Die Funktionsstörungen führen infolge der Beeinträchtigung der ATP-Synthese durch das mitochondriale System der oxidativen Phosphorylierung zu einer verminderten ATP-Konzentration im fetalen Hirngewebe.
3. Die klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung verabreichte Betamethasondosis ist bezüglich ihrer Effekte auf die Funktion der Atmungskette und den Energiestoffwechsel im fetalen Gehirn supramaximal.

Wir untersuchten deshalb bei fetalen Schafen im Alter von 0.73 der Gestationsdauer, das entspricht etwa der 28. SSW beim Menschen, die Effekte von Betamethason in der klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung verwendeten oder mit der auf die Hälfte bzw. ein Viertel reduzierten Dosis auf:

1. die Funktionen der mitochondrialen Atmungskette im zerebalen Kortex, Thalamus, Striatum und Hippokampus;
2. die Gewebekonzentrationen von ATP, um die Bedeutung der Betamethasonwirkung auf die Funktionen der Atmungskette für den zellulären ATP- und Energiegehalt und damit die biologische Wertigkeit der Betamethasonwirkung auf die mitochondriale Atmungskette für die Zellfunktion besser beurteilen zu können.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL UND HIRNPROBENGEWINNUNG

Die Versuche wurden an Schafen der Rasse Rambouillet-Columbia am Center for the Study of Fetal Programming, Department of Animal Science, University of Wyoming durchgeführt. Das University of Wyoming Animal Care and Use Committee genehmigte die Untersuchungen. Trächtige Muttertiere mit bekanntem Konzeptionsdatum erhielten im Alter von  $112 \pm 1$  Gestationstagen (Trächtigkeitsdauer 150 Tage),  $2 \times 42,5 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  ( $n = 7$ ),  $85 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  ( $n = 8$ ) oder  $170 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  ( $n = 8$ ) Betamethasonphosphat (Celestan soluble, Essex, München) oder eine äquivalente Menge einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung ( $n = 7$ ) im Abstand von 24 h intramuskulär injiziert. Eine Konzentration von  $170 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  Betamethason entspricht der, bei der antenatalen Glukokortikoidtherapie zur Förderung der Lungenreifung des Feten, klinisch angewendeten Dosis von 12 mg Betamethason für eine Frau von 70 kg Gewicht. Die Zuteilung der Tiere zu den vier Gruppen erfolgte zufällig.

Die Entnahme der fetalen Hirngewebeproben erfolgte 24 h nach der zweiten Injektion. Zunächst erhielten alle Mutterschafe eine Prämedikation mit 1 g Ketamin i. m. Anschließend wurden die Feten unter Vollnarkose der Muttertiere mit 4 % Isofluran (Ketaflo, Abbott, North Chicago, Illinois, USA) per Kaiserschnitt entbunden. Nach dem die Föten unter Halothan-Narkose durch Exsanguination getötet worden waren, wurden durch schnellstmögliche Präparation und sorgfältige Aufbereitung der vier Regionen zerebraler Kortex, Thalamus, Striatum und Hippokampus Gewebeproben vom fetalen Gehirn entnommen, umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Homogenisation und Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die so gewonnenen Hirngewebeproben wurden uns freundlicherweise für die Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe und die Bestimmung der ATP-Konzentration überlassen.

Die Mutterschafe wurden durch die Injektion von 1 ml/kg Na-Pentobarbital (Fatal-Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, Michigan, USA) getötet.



## **3.2 AKTIVITÄTSMESSUNGEN DER ENZYMKOMPLEXE DER ATMUNGSKETTE**

### **3.2.1 Chemikalien**

Für die Messungen der Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette wurden folgende Chemikalien verwendet:

KCl, Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , K-Na-Tartrat,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , EDTA-Na,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Succinat-Na, DTNB (5,5-Dithiobis-[2-Nitrobenzoesäure]), Acetyl-CoA, Oxalacetat,  $\text{NaN}_3$ , Cytochrom c vom Rinderherzen, Antimycin A von Streptomyces sp.,  $\beta$ -NADH, 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP),  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , Ascorbinsäure, Sephadex G25 und Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz (2.0 Normal) von Sigma (St. Louis, Missouri, USA)

D-Mannitol von ICN Biomedicals (Irvine, Kalifornien, USA)

BSA (Rinderserumalbumin, Albuminfraktion V) von Merck (Darmstadt, Deutschland)

Phenazinmethosulfat (PMS) von Serva (Heidelberg, Deutschland)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  von Fluka (St. Gallen, Schweiz)

### **3.2.2 Aufarbeitung des Hirngewebes**

Nach dem Einwiegen von etwa 70 mg der gefrorenen Gewebeprobe erfolgte die Homogenisierung auf Eis mit Hilfe eines Glas/Glas-Hand-Homogenisators (Glas/Glas-Potter „Tenbroeck“ 2 ml, Kimble-Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey, USA) über 5 bis 10 Minuten in modifiziertem Chappel-Perry-Medium folgender Zusammensetzung:

100 mM KCl, 50 mM Tris; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EDTA; pH = 7,5 mit 1 N HCl eingestellt. Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt und im Masse-Volumenverhältnis 1:20 [mg:µl] zugegeben.

Für die spätere Proteinbestimmung nach Lowry wurden zunächst 40 µl des so gewonnenen Homogenats entnommen und in mit der Probenkennung beschrifteten und datierten Eppendorf-Gefäßen unter Zusatz von 50 mM NaOH im Verhältnis 1:10 bei -20°C gelagert.

Während der folgenden Messungen verblieb das Homogenat für etwa eine Stunde in einem geschlossenen Reaktionsgefäß permanent auf Eis.

### 3.2.3 Proteinbestimmung

Die Angaben zu den spezifischen Enzymaktivitäten beziehen sich auf den individuellen Gehalt an nicht-kollagenem Protein (NCP) in jeder Gewebeprobe. Dieser wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt:

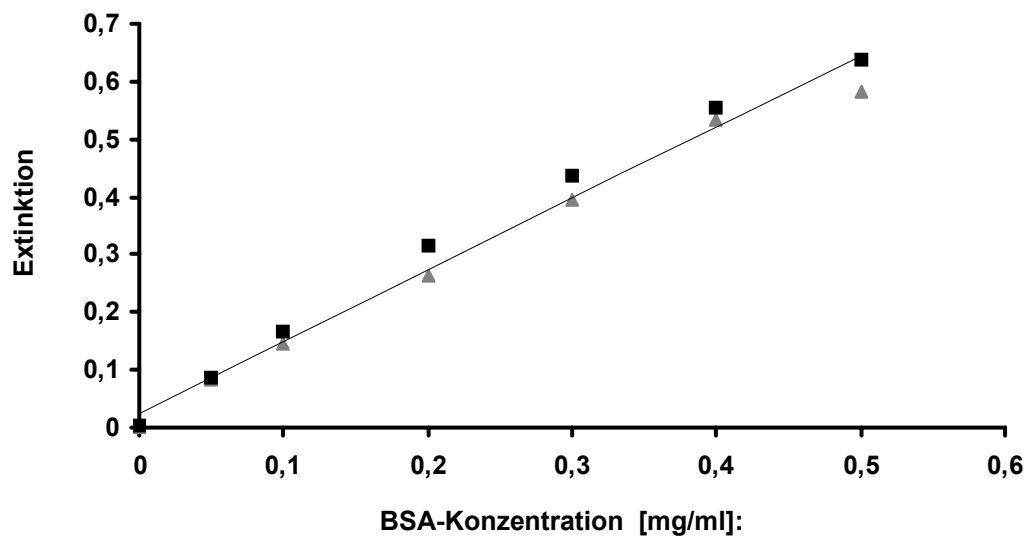
Dabei bildet Kupfer mit dem Protein im alkalischen Milieu einen Komplex, der durch die Reduktion von Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zu einer photometrisch erfassbaren Farbreaktion führt. Die Messungen wurden mit demselben UV/Vis-Spektrophotometer „Lambda 20“ (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) und in den gleichen Einweg-Halb-Mikro-Küvetten „PS“ 10 x 4 mm; 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) durchgeführt, die auch für die Bestimmung der Enzymaktivitäten Verwendung fanden.

#### *Reagenzien:*

- Reagenz A: 2 %-ige  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 M NaOH
- Reagenz B: 1,25 % K-Na-Tartrat, 0,5 %  $\text{CuSO}_4$  in 0,1 M NaOH
- Reagenz C: 50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B
- Reagenz D: Phenolreagenz +  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 1:1

Die Bestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Abb. 2). Als Referenzwerte wurden aus einer 0,1 %-igen BSA-Stammlösung fünf unterschiedliche Verdünnungen definierter Konzentration hergestellt: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg BSA pro ml  $\text{H}_2\text{O}$  sowie ein Leerwert. Für den ermittelten Konzentrationsbereich wurde ein nahezu linearer Verlauf einer Regressionsgeraden erwartet, deren Genauigkeit durch die r-Werte bestimmt sein würde. Der r-Wert der in Doppelbestimmung ermittelten Eichkurve sollte größer als 0,98 sein.

Die Bestimmung des Proteingehalts der verdünnten Homogenatproben erfolgte wie bei den Enzymaktivitäten in Doppelbestimmung. Zu diesem Zweck wurden 20 bzw. 40  $\mu\text{l}$  der bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerten Homogenate direkt nach dem Auftauen auf 100  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt, mit 1,0 ml Reagenz C versetzt, gut gemischt und 12 min bei  $21^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  Reagenz D (Phenolreagenz 1:1) hinzugegeben und weitere 30 min bei  $21^\circ\text{C}$  inkubiert. Die folgende Endpunktmessung wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm bei  $30^\circ\text{C}$  (10 min Vorinkubation) durchgeführt.



**Abb. 2** Beispiel einer Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Lowry

Dargestellt ist die Extinktion in Abhängigkeit von der Konzentration der BSA-Standardlösungen. Wertepaare der BSA-Standardlösungen mit unterschiedlich hohem Lösungseinsatz: Quadrate = 20 µl, Dreiecke = 40 µl,  $r = 0,995$ , BSA = Bovines Serum-Albumin

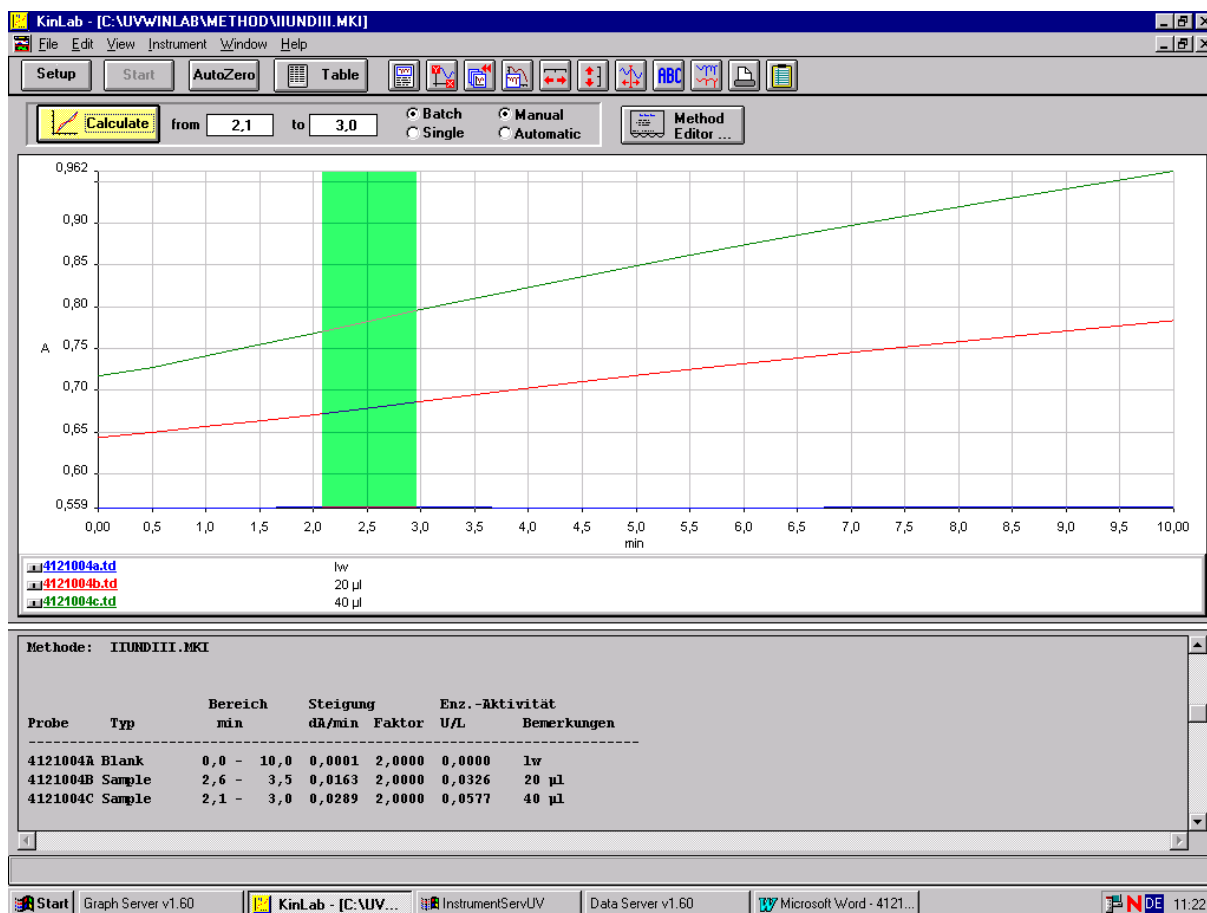
### 3.2.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten mittels Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte spektralphotometrisch bei 30°C im sichtbaren Bereich. Der Zusammenhang von Extinktion und Stoffkonzentration wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz in bestimmten Konzentrationsbereichen als linear angenommen und bildet, entsprechend dem Prinzip des optisch-enzymatischen Tests, die Grundlage für die Berechnung der Enzymaktivitäten nach der modifizierten Formel:

$$S.A. = \frac{\Delta E/min \times V_m \times F_v}{\epsilon \times V_p \times NCP} \quad (1)$$

- S.A.*: Spezifische Aktivität [mmol/(min × NCP)]  
*ΔE/min*: Extinktionsänderung pro Minute (Maximalgeschwindigkeit)  
*V<sub>m</sub>*: Messvolumen in der Küvette [µl]  
*F<sub>v</sub>*: Verdünnungsfaktor  
*ε*: molarer Extinktionskoeffizient [mM<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]  
*V<sub>p</sub>*: Probenvolumen [µl]  
*NCP*: nicht-kollagenes Protein [mg/ml]

Für die Aktivitätsmessungen wurden Stammlösungen hergestellt. Die Molaritäten der später im Einzelnen beschriebenen Testansätze entsprechen den geforderten Konzentrationen. Nach einem Pipettier-Schema erfolgte die Zugabe definierter Volumina der Stammlösungen sowie drei unterschiedlicher Volumina des zu untersuchenden Homogenats (Leerwert, Hauptwert, doppelter Hauptwert) und die Verdünnung mit Wasser auf ein Testendvolumen von jeweils 1 ml. Bis zum Start inkubierten die Ansätze für 10 min bei 30°C. Als Puffersystem für die Komplexe der Atmungskette wurden 1 M bzw. 0,1 M Kalium-Phosphat-Stammlösungen verwendet, die mit Natrium-Phosphat-Lösungen entsprechender Molarität auf die benötigten pH-Werte titriert wurden. Natrium-Azid fungierte als selektiver Hemmstoff von Komplex IV. Das UV/Vis-Spektrophotometer „Lambda 20“ (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) ermöglicht durch den Einsatz des nachgerüsteten Küvettenwechselsystems, bestehend aus Linear-Transporter-Grundeinheit und Achtfach-Küvettenhalter mit Wassermantel, das gleichzeitige Messen von bis zu acht Proben. So war die simultane Doppel- und Leerwertbestimmung möglich. Dadurch und durch den angeschlossenen Kälte-Umwälzthermostat „F12-E“ (Julabo, Seelbach, Deutschland) war das genaue Einhalten der Temperatur von 30°C und der konstanten Abstände zwischen den einzelnen Messpunkten der Verlaufskurve gewährleistet. Die Schichtdicke der verwendeten Einweg-Halb-Mikro-Küvetten „PS“ 10 x 4 mm; 1,5 ml (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) beträgt 1 cm. Die Berechnung der Extinktionsänderung erfolgte graphisch mit Hilfe der dafür vorgesehenen Funktion des Steuerprogramms „UV-Kinlab“ Version 2.80.02 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) auf einem Windows-98-PC (Abb. 3). Dabei wurden lediglich Bereiche maximaler Änderungsgeschwindigkeit berücksichtigt, wobei mindestens 2 Messpunkte einbezogen wurden. Die Software errechnet die Extinktionsdifferenz automatisch in Bezug auf die der gleichzeitig durchgeführten Leerwertbestimmung.



**Abb. 3** Benutzeroberfläche der Software UV-Kinlab nach erfolgter Messung und graphischer Auswertung am Beispiel der Messung zum Komplex II + III

Der grün gekennzeichnete Bereich markiert den Abschnitt des maximalen Anstiegs. Das Programm berechnet mit den Messwerten dieses Zeitabschnitts die Steigung der Messkurven in diesem Bereich. Im grauen unteren Feld werden diese Werte, der markierte Bereich, und die berechneten Steigungen und Enzymaktivitäten angegeben, die das Programm aus den Werten des grün markierten Zeitraumes berechnet. Sie wurden später ins Protokollbuch übernommen und dienten als Berechnungsgrundlage für die spezifischen und normierten Aktivitäten. Jede der drei Messkurven steht für den Einsatz an Gewebehomogenat:

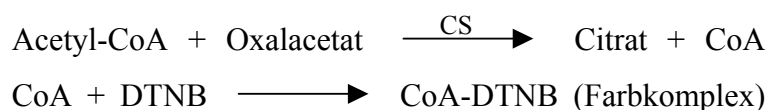
Blau = Leerwert (LW), Rot = 20 µl; Blau = 40 µl

### 3.2.4.1 Aktivitätsbestimmung des mitochondrialen Markers Citratsynthase (CS)

Die Citratsynthase (CS) ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Von diesem Enzym ist bekannt, dass es streng mit dem Mitochondriengehalt korreliert (Schwermann et al. 1989).

Die CS ist als mitochondriales Markerenzym daher gut geeignet.

*Reaktionsprinzip:*



Das aus der Reaktion unter Beteiligung der Citratsynthase freigewordene Coenzym A (CoA) bildet mit 5,5-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) einen bei 412 nm ( $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) spektrophotometrisch detektierbaren Farbkomplex. (Shepherd und Garland 1969). Die Enzymaktivität lässt sich aus dem Anstieg der gemessenen und auf den gleichzeitig bestimmten Leerwert bezogenen Extinktionsänderung nach der bekannten Formel (1) berechnen. Im Falle der Citratsynthase wurden Tris als Pufferlösung verwendet. Testendvolumen: 2,0 ml.

*Testansatz:* 46 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; 185 mM Mannitol, 100  $\mu\text{M}$  DTNB (Stamm: 10 mM in 0,1 M Tris), pH = 8,0; 100  $\mu\text{M}$  Acetyl-CoA; 0, 20 bzw. 40  $\mu\text{l}$  Homogenat  
*Start:* 0,5 mM Oxalacetat (50 mM Stammlösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und mit 1 M KOH auf einen pH von 6,0 bis 7,0 eingestellt.)

### 3.2.4.2 Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette

#### 3.2.4.2.1 Komplex I + III (NADH-Cytochrom-c-Reduktase)

Das Prinzip geht zurück auf Hatefi und Rieske (1967): Cytochrom c wird sowohl durch die NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase als auch durch die NADH-Cytochrom-b5-Oxidoreduktase reduziert (Szczesna-Kaczmarek et al. 1984). Der Umsatz ist bei 550 nm messbar ( $\epsilon = 21,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Da für die zweite Reaktion kein Hemmstoff existiert, wird Komplex III selektiv durch Zugabe von in Ethanol gelöstem Antimycin A gehemmt. Die nach der Hemmung verbleibende Restaktivität entspricht der Aktivität der NADH-Cytochrom-b5-Oxidoreduktase.

*Testansatz:* 50 mM K-Na-Phosphat-Puffer, pH = 8,0; 0,1 mM EDTA-Na, pH = 8,0; 2,5 mM  $\text{NaN}_3$ , pH = 7,4; 80  $\mu\text{M}$  Cytochrom c; 5  $\mu\text{g/ml}$  Antimycin A; 0, 20 bzw. 40  $\mu\text{l}$  Homogenat;  
*Start:* 0,2 mM NADH (Stammlösung: 10 mM NADH in 10 mM Tris-HCl, pH = 8,0)

#### 3.2.4.2.2 Teil von Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, SDH)

Für die Reduktion von Succinat zu Fumarat (Arrigoni und Singer 1962) werden Phenazinmethosulfat (PMS) und 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) als Elektronenakzeptoren benötigt. Bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) wird die Reduktion des terminalen Akzeptors DCIP bestimmt.

*Testansatz:* 50 mM K-Na-Phosphat-Puffer, pH = 7,4; 0,1 mM EDTA-Na, pH = 7,4; 0,1 % BSA, 2,5 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM Succinat-Na, pH = 7,4; 0, 20 bzw. 40 µl Homogenat, *Start:* 35 µM DCIP und 1,63 mM PMS. Die PMS-Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt.

#### 3.2.4.2.3 *Komplex II + III (Succinat-Cytochrom-c-Reduktase)*

Die Reduktion von Cytochrom c durch die Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Tisdal 1967) wird bei einer Wellenlänge von 550 nm ( $\epsilon = 21,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) verfolgt.

*Testansatz:* 50 mM K-Na-Phosphat-Puffer, pH = 7,4; 0,2 mM EDTA-Na, pH = 7,4; 0,1 % BSA, 2,5 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM Succinat-Na, pH = 7,4; 0, 20 bzw. 40 µl Homogenat, *Start:* 80 µM Cytochrom c

#### 3.2.4.2.4 *Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase, COX)*

Gemessen wird die Oxidation von reduziertem Cytochrom c durch die COX bei einer Wellenlänge von 550 nm ( $\epsilon = 21,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Statt des üblichen Leerwertes fand die Extinktion nach dem Stopp der Reaktion mit dem Oxidationsmittel K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, das Cytochrom c in die vollständig oxidierte Form überführt und so den Endpunkt der Reaktion simuliert, Eingang in die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung:

$$k_n = 2,3 \times 6 \times \lg \times \left( \frac{E_n - E_{\text{Stop}}}{E_{n+1} - E_{\text{Stop}}} \right) \times \text{min}^{-1} \quad (2)$$

$k_n$ : Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung zwischen Messpunkten n und n + 1 [ $\text{min}^{-1}$ ]  
 $E_n$ : Extinktion zum Zeitpunkt n der Messung (n = 0 – 9)

Dabei wurden alle neun Messpunkte der 1,5 Minuten währenden Messperiode berücksichtigt und auf diese Weise für jeden Abschnitt die zugehörige Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Aus dem Mittelwert aller neun Geschwindigkeitskonstanten erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität der COX nach der bekannten Formel (1), wobei das Mittel der Konstanten den Ausdruck  $\Delta E/\text{min} \times \epsilon^{-1}$  ersetzte.

*Testansatz:* 60 µM reduziertes Cytochrom c, 10 mM K-Na-Phosphatpuffer, pH = 7,0;  
*Start:* 20 bzw. 40 µl Homogenat  
*Stop:* 10 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>

*Herstellung des reduzierten Cytochrom c:* Das für die Trennung von reduziertem Cytochrom c und Reduktionsmittel verwendete Sephadex G25 wurde über Nacht zum Quellen in 20mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 7,4, belassen. Am nächsten Tag wurden 2,0 ml einer 2 %-igen Cytochrom-c-Lösung in 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,4, mit 35 mg Ascorbinäure reduziert. Die Trennung des reduzierten Cytochrom c vom Reduktionsmittel erfolgte gelchromatographisch in einer mit dem fertigen Gel gefüllten Chromatographie-Glas-Säule mit eingeschmolzener Fritte (Porosität 0), Hülse NS 14/23, PTFE-Hahn, 200 × 15 mm und einem Volumen-Inhalt von 35 cm<sup>3</sup> (Normschliff Gerätebau Wertheim, Wertheim, Deutschland). Das Eluat wurde in Aliquote aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Um Fehler bei der COX-Aktivitätsbestimmung durch eventuell anwesendes Reduktionsmittel auszuschließen, wurde der Reduktionsgrad photometrisch bei 550 nm kontrolliert. Die Extinktion von 70 µl reduziertem Cytochrom c in 930 µl Puffer sollte zwischen 1,0 und 1,2 liegen (Wharton und Tzagoloff 1967).

### **3.3 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ATP**

#### **3.3.1 Chemikalien**

Für die Messungen der Konzentration von ATP wurden folgende Chemikalien verwendet:

Methanol, KOH, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von Roth (Karlsruhe, Deutschland),

HCl 25 % und Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) 70 % von Fluka (St. Gallen, Schweiz),

EGTA, KCl von Sigma (St. Louis, Missouri, USA),

Trap (Triäthanolamin-HCl-Puffer), MgCl<sub>2</sub>, alpha-D-Glukose, β-NADP, β-NADPH, Ammoniumsulfat sowie ATP von Serva (Heidelberg, Deutschland),

Hexokinase 450 U/mg (susp.) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) 140 U/mg (susp.) von Roche (Basel, Schweiz).

#### **3.3.2 Aufarbeitung des Hirngewebes**

Jeweils ca. 60 bis max. 100 mg des gefrorenen Hirngewebes wurden zum Aufschluss der Fettbestandteile direkt in einem 2-ml-Reaktionsgefäß mit „safety lock“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einer Methanol-HCl-Lösung (99 % Methanol, 1 % HCl) im Verhältnis 1:2 (Gewicht der Probe [mg] : Volumen der Lösung [µl]) versetzt und manuell homogenisiert. Nach der Zugabe einer Lösung mit 0,6 M HClO<sub>4</sub> und 1 mM EGTA im Masse-Volumen-Verhältnis 1:10 [mg:µl] zur Deproteinisierung folgte im gleichen Arbeitsschritt mit einem



kommerziell erhältlichen Mikropistill für 1,5- und 2-ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) die wiederholte Homogenisierung im Reaktionsgefäß.

Zur enzymatischen Bestimmung der Metabolitkonzentration wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge „5415 R“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 4°C und 9800 U/min über 2 min zentrifugiert und der gewonnene Überstand mit der 0,82-fachen Menge 100 mM Trappuffer, pH 7,5, verdünnt. Der pH-Wert wurde durch Fällung mit einer Lösung aus 3 N KOH und 0,5 N KCl auf einen Wert im Bereich von 6 bis 8 titriert. Hierbei kam ein speziell für kleine Reaktionsgefäße geeignetes pH-Meter „InLab 423 Mikro-pH-Kombinationselektrode“ (Mettler Toledo, Schwärzenbach, Schweiz) zum Einsatz, um das Einstellen des pH-Wertes für jede einzelne Probe in den kleinen Reaktionsgefäßen zu ermöglichen. Das Sediment wurde nach erneuter Zentrifugation (9800 U/min, 2 min) verworfen und das so gewonnene Zellextrakt in mit Datum und Probenkennung versehenen Reaktionsgefäßen bei -80°C bis zum Messeinsatz aufbewahrt.

Um das Erhalten der Kühlkette während der Aufarbeitung zu gewährleisten, fand ein Metallblock mit Vertiefungen für 49 Reaktionsgefäße Verwendung, der vor der Präparation über Nacht bei -80°C belassen wurde und in dem die Homogenate zwischen den einzelnen Arbeitsschritten unter permanenter Kühlung bei weniger als -20°C aufbewahrt werden konnten.

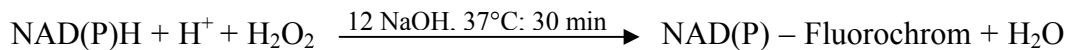
Neben den eigentlichen Proben wurde auch der ATP-Gehalt eigens angefertigter Kontroll-Lösungen definierter Konzentration bestimmt. Diese wurden zuvor genau den gleichen Präparationsschritten unterzogen und gemeinsam mit den Gewebeproben verarbeitet, aufbewahrt und eingesetzt, wobei später statt 1 mg Hirngewebe 1 µl Kontrolllösung als Berechnungsgrundlage diente.

### **3.3.3 Prinzip der Konzentrationsbestimmung von ATP mittels Fluoreszenzspektrometrie**

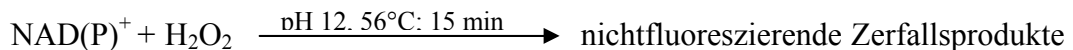
Zur Bestimmung von ATP-Konzentrationen im Hirngewebe fetaler Schafe wurde in Vorversuchen mit fluorometrischen Messungen nach Lowry und Passonneau (1972) begonnen. Bestandteil der Bestimmung von Energiestoffwechselmetaboliten nach Lowry und Passonneau ist die Fluoreszenzspektrometrie. Diese macht sich die Eigenschaft des NAD(P)/NAD(P)H<sub>2</sub>-Systems zunutze, im stark alkalischen Milieu Fluorochrome zu bilden,

die bei Wellenlängen von 360 bzw. 450 nm ihre Maxima der Anregungs- bzw. Emissionsspektren besitzen.

*Folgende Messreaktion läuft dabei ab:*

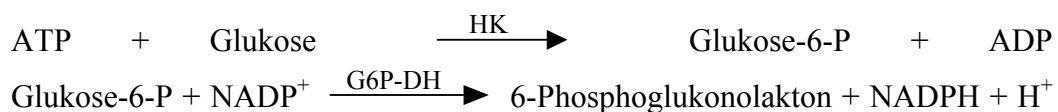


Zur Zerstörung von NAD(P), das nach dem Abbruch der unten beschriebenen enzymatischen Reaktionen noch vorliegt, ist folgende Hilfsreaktion notwendig:



Das Dinukleotid  $\text{NADP}^+$  dient bei der im Folgenden beschriebenen enzymatischen Nachweisreaktion für ATP mit Hexokinase (HK) (Trautschold et al. 1989) als Coenzym der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

*Nachweisreaktion zur Bestimmung von ATP:*



Das aus der Phosphorylierung von Glukose unter Verbrauch von ATP hervorgehende Glukose-6-Phosphat wird im zweiten Reaktionsschritt vollständig zur Gewinnung von reduziertem  $\text{NADP}^+$  benötigt. So entsteht pro mol ATP ein mol  $\text{NADPH/H}^+$ . Dieses kann durch die oben beschriebenen Reaktionen mit Bildung von Fluorochromen am Spektrofluorophotometer „RF-1502“ (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) in einer Quarzglasküvette „QS“ 10 x 4 mm, 1,5 ml (Hellma Müllheim, Deutschland) bestimmt werden. Die Berechnung erfolgte anhand einer  $\text{NADPH/H}^+$ -Standardkurve, die mit Hilfe der Steuersoftware „PC-1501 Fluorescence Software“ (Shimadzu, Columbia, MD USA) für das Spektrofluorophotometer an einem Windows-98-PC erstellt wurde, in Bezug auf den gleichzeitig bestimmten Leerwert der Probe.

*Testansatz:* 42,5 mM Tris-Puffer, pH 7,5 (bereits im Zellextrakt enthalten); 6,66 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM NADP, 0,6 mM Glucose, 20 µl Homogenat,

1,75 kU/l G6P-DH (anschließend 10 min Inkubation bei 21°C)

*Start:* 11,25 kU/l Hexokinase (entsprechend 10 µl verdünnter Lösung) für beide Hauptwerte bzw. 0,96 M Ammoniumsulfat für den Leerwert (anschließend 15 min Inkubation bei 21°C)

*Fluoreszenzreaktion:* Dem Testansatzvolumen von 200 µl wurden 20 µl 1,2 N NaOH zugesetzt und bei 56 bis 60°C für 15 min inkubiert. Nach Zusatz von 200 µl 12 N NaOH in 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 150 µl des Ansatzes entnommen und im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. In einem Testendvolumen von 1,5 ml konnte nun die NADPH-Konzentration im Spektrofluorophotometer bestimmt und die Konzentration von ATP stöchiometrisch nach dem Prinzip des optisch-enzymatischen Tests, entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz, berechnet werden:

$$C_{ATP} = \frac{\Delta E \times V_m \times F_V \times F_U}{\varepsilon \times V_P} \quad (3)$$

$C_{ATP}$ :	ATP-Konzentration [mmol/kg Frischgewicht]
$\Delta E$ :	Extinktionsdifferenz zum Leerwert [cm <sup>-1</sup> ]
$V_m$ :	Messvolumen in der Küvette [µl]
$F_V$ :	Verdünnungsfaktor [g <sup>-1</sup> ]
$F_U$ :	Umrechnungsfaktor
$\varepsilon$ :	millimolarer Extinktionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> × cm <sup>-1</sup> ]
$V_P$ :	Probenvolumen [µl]

Der Verdünnungsfaktor  $F_V$  berechnet sich aus den zur Gewebeextraktion verwendeten und dokumentierten Lösungs- und Gewebemengen.

### 3.3.4 Konzentrationsbestimmung von ATP mittels Absorptionsspektrometrie

Da sich die fluorometrische ATP-Bestimmung nach Lowry und Passonneau (1972) in den Vorversuchen als zu unempfindlich für die niedrigen fetalen ATP-Gewebekonzentrationen erwies, haben wir den Gewebeeinsatz sowie den Einsatz der Enzymlösungen von Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) pro Messansatz erhöht, um ATP-Konzentrationsbereiche im Messansatz zu erhalten, in denen die Nachweisreaktion (Trautschold et al. 1989, s. voriges Kap.) sicher abläuft. Dabei war zu beachten, dass eine Konzentrierung des Homogenats und der in einer Ammoniumsulfatlösung in Suspension

vorliegenden Enzyme Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aufgrund ihrer möglichen Eigenfluoreszenz zu einer weiteren Verstärkung von Messfehlern in der Fluoreszenzspektrometrie führen können. Die stärkere Trübung des Messansatzes stellt eine weitere mögliche Fehlerquelle dar. Daher stellten wir die Messmethode auf die Absorptionsspektrometrie (Trautschold et al. 1989, s.u.). Dabei stellte sich heraus, dass Messungen von niedrigen ATP-Gewebekonzentrationen mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie gut reproduzierbar sind.

Das Prinzip der Nachweisreaktion ist mit dem der Fluoreszenzmessung (Kap. 3.3.3) identisch, jedoch entfallen die Fluorochrome bildenden Reaktionsschritte. NADPH/H<sup>+</sup> ist im UV/Vis-Spektrophotometer (Amersham, Ultrospec 3300 pro, Cambridge, England) durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) detektierbar und aufgrund der stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktion direkt in die ATP-Konzentration nach Formel (3) umzurechnen. Analog zur Formel (1) folgt diese den Prinzipien des optisch-enzymatischen Testes und hat somit das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Grundlage.

Die Extinktion verhält sich also direkt proportional zum ATP-Gehalt. Eine Minimierung von Fehlbestimmungen ist durch die Verwendung von Messbereichen mit Extinktionen über 0,05 möglich. Aus diesem Grunde war es notwendig, das Probenmaterial möglichst wenig zu verdünnen, so dass ein hinreichend hoher ATP-Gehalt erwartet werden konnte.

Die Homogenisierung der Hirngewebeproben erfolgte daher zunächst analog der Präparation der Proben bei der Fluoreszenzspektrometrie (Kap. 3.3.2), jedoch in dreifach höherer Einwaage von 240 bis 300 mg Hirngewebe (statt 80 bis 100 mg Hirngewebe) und Adaptation der Masse-Volumenverhältnisse. So sollte eine Verdreifachung des ATP-Gehalts je Homogenatvolumen erreicht werden. Weiter wurde der Homogenateinsatz pro Testansatz im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmessung verdoppelt. Da das Testansatzvolumen bei der Absorptionsspektrometrie 1,0 ml statt 0,2 ml bei der Fluoreszenzspektrometrie betrug, wurde fünfmal mehr Homogenat pro Test benötigt. Im Verhältnis zur Fluoreszenzspektrometrie ergibt sich bei der Bestimmung der ATP-Konzentration mittels Absorptionsspektrometrie aus den Faktoren Drei (eine dreimal höhere Gewebeeinwaage), Zwei (ein verdoppelter Homogenateinsatz) und Fünf (ein fünfmal höheres Testansatzvolumen) somit ein ca. 30-mal höherer Gewebeeinsatz pro Test.

Die Konzentrationen der Enzyme Hexokinase (HK) und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) sowie von  $\text{MgCl}_2$  und den Substraten Glukose und NADP im Testansatz wurden etwa verdoppelt.

Die Endpunkt-Messung der Extinktion erfolgte als Differenz zu einem gleichzeitig gemessenen Leerwert in Doppelbestimmung (Bostick und Ausmus 1978) anhand einer ATP-Standardkurve, die mit Hilfe der Steuersoftware „Swift II Applications Software“ (Amersham, Cambridge, England) für das Absorptionsspektrophotometer erstellt wurde. Es wurde in Einweg-Halb-Mikro-Küvetten „PS“ 10 x 4 mm; 1,5 ml (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) der Schichtdicke 1 cm in einem Testendvolumen von 1 ml gemessen.

*Testansatz:* 42,5 mM Trap-Puffer, pH 7,5 (bereits im Zellextrakt enthalten); 13,32 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 mM NADP, 1,1 mM Glukose, 600  $\mu\text{l}$  Homogenat, 3,5 kU/l G6P-DH (anschließend 10 min Inkubation bei 21°C)

*Start:* 22,5 kU/l Hexokinase (entsprechend 50  $\mu\text{l}$  verdünnter Lösung) für beide Hauptwerte bzw. 0,96 M Ammoniumsulfat für den Leerwert (anschließend 15 min Inkubation bei 21°C bis zur Messung der Extinktion)

### **3.4 STATISTISCHE ANALYSEN**

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Proteingehalt, Enzymaktivitäten und ATP-Gehalt der Hirngewebeproben wurden mit denen der Kontrollgruppen verglichen und mit dem Student t-Test (MS Excel) für ungepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft (Gellerich et al. 2002, Maurer et al. 2001). Die Alpha-Adjustierung für multiple Tests erfolgte nach Holm und Schaffner (Horn und Vollandt 1995). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 GLUKOKORTIKOIDEFFEKTE AUF DIE AKTIVITÄTEN DER ENZYMKOMPLEXE DER ATMUNGSKETTE

#### 4.1.1 Vorbetrachtungen und Bezugsgrößen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bezugsgrößen für die Bestimmung der Enzymkomplexaktivitäten der Atmungskette sind der Proteingehalt des untersuchten Homogenats und die Aktivitäten der mitochondrial lokalisierten Enzyme Citratsynthase (CS) und Succinat-Dehydrogenase (SDH) im Homogenat.

Die Angabe der Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette erfolgt zunächst jeweils normiert auf den nach Lowry bestimmten nichtkollagenen Proteingehalt der Proben als „spezifische Aktivität“.

Da die Citratsynthase in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist und gut mit dem Mitochondriengehalt korreliert (Schwerzmann et al. 1989), kann sie als Marker für den Mitochondriengehalt des untersuchten Gewebes genutzt werden (s. Kap. 3.2.4.1). Mit der Normierung der Atmungskettenkomplexaktivitäten auf die Aktivität der Citratsynthase können die Atmungskettenkomplexaktivitäten als „CS-normierte Aktivität“ unabhängig vom Mitochondriengehalt der Gewebeprobe dargestellt werden.

Außerdem erfolgte eine Normierung der Atmungskettenkomplexaktivitäten auf die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase. Die Succinat-Dehydrogenase ist als Teil von Komplex II ein Teil des Systems der Atmungskette, mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert und am Elektronentransport beteiligt. Sie unterliegt dabei der Elektronenflusskontrolle durch die anderen Atmungskettenkomplexe. Komplex II ist der einzige der Atmungskettenkomplexe, dessen Proteinbausteine ausschließlich nukleär kodiert werden und somit der einzige von der mitochondrialen Biogenese unabhängige Enzymkomplex der Atmungskette. Die Normierung der Aktivitäten der sowohl nukleär als auch mitochondrial kodierten Atmungskettenkomplexe I + III, II + III und IV auf die Aktivität der ausschließlich nukleär kodierten Succinat-Dehydrogenase erlaubt im Zusammenhang mit der Darstellung als „SDH-normierte Aktivität“ Aussagen zur Regulation der Atmungskettenkomplexe durch das mitochondriale Genom unter Berücksichtigung der funktionellen Einheit der Atmungskette. Andererseits katalysiert die Succinat-Dehydrogenase als Bestandteil des Citratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat und schafft unter Reoxidation des Reduktionsäquivalents FAD eine zweite

Möglichkeit, Elektronen aus der Substratoxidation im Citratzyklus in die Atmungskette einzuschleusen. Damit fungiert die Succinat-Dehydrogenase nicht nur als Normierungs- sondern auch als Messgröße.

#### 4.1.1.1 Proteingehalt nach Lowry

Der Gehalt der Gewebeproben an nicht-kollagenem Protein (NCP) war im Thalamus um ca. 15 % höher und im Hippokampus um ca. 23 % höher als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Tab. 1). Im Striatum war der Proteingehalt tendenziell höher als im zerebralen Kortex. Der Proteingehalt im Kortex war damit insgesamt niedriger als in den anderen drei untersuchten Regionen.

Der Proteingehalt blieb von einer Betamethasonbehandlung weitgehend unbeeinflusst (Tab. 1). Tendenziell war mit steigender Betamethasondosis zwar eine Zunahme des Proteingehaltes in allen Hirnregionen zu beobachten, die jedoch nach Alpha-Adjustierung lediglich im Thalamus und nach der höchsten Dosis von 170  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  Betamethason (BM) signifikant wurde und ca. 15 % betrug ( $p < 0,05$ ).

Region	Proteingehalt der Homogenate nach Lowry [mg NCP/(g FG)]			
	Kontrolltiere	42,5 $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$ BM	85 $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$ BM	170 $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$ BM
	(n = 7)	(n = 7)	(n = 8)	(n = 8)
Kortex	$77,0 \pm 3,0$	$81,1 \pm 9,3$	$84,1 \pm 3,1$	$86,5 \pm 5,0$
Thalamus	$88,9 \pm 3,8$ §	$97,9 \pm 3,1$	$98,1 \pm 4,3$	$102,5 \pm 6,1$ *
Striatum	$87,8 \pm 5,5$	$87,5 \pm 2,7$	$79,1 \pm 7,1$	$95,0 \pm 4,9$
Hippokampus	$94,8 \pm 3,4$ §	$97,5 \pm 2,9$	$102,3 \pm 3,2$	$102,7 \pm 4,9$

**Tab. 1** Proteingehalt nach Lowry in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. § $p < 0,05$  im Vergleich zum Kortex.

170  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, FG = Feuchtgewicht; KG = Körpergewicht.

#### 4.1.1.2 Spezifische Aktivität des mitochondrialen Markers Citratsynthase

Die spezifische Aktivität der Citratsynthase war im Thalamus ca. 48 % und im Hippokampus ca. 46 % höher als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Tab. 2). Thalamus und Hippokampus wiesen damit einen höheren Mitochondriengehalt auf als zerebraler Kortex und Striatum. Im zerebralen Kortex war eine Tendenz zur Zunahme der spezifischen Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Citratsynthase nach Betamethason zu beobachten, wobei die Zunahme um ca. 36 % nach einer Dosis von 42,5 µg/(kg KG) BM auch signifikant war ( $p < 0,05$ ). In keiner der drei anderen untersuchten Hirnregionen Thalamus, Striatum und Hippokampus hatte die Betamethasonbehandlung einen Effekt auf die spezifische Aktivität der Citratsynthase (Tab. 2).

Region	Spezifische Aktivität der Citratsynthase [nmol/(min × mg NCP)]			
	Kontrolltiere (n = 7)	42,5 µg/(kg KG) BM (n = 7)	85 µg/(kg KG) BM (n = 8)	170 µg/(kg KG) BM (n = 8)
Kortex	27,4 ± 4,6	37,3 ± 2,2 *	30,8 ± 2,5	33,3 ± 3,4
Thalamus	40,5 ± 4,8 §	41,7 ± 3,2	38,6 ± 4,9	38,7 ± 5,6
Striatum	32,8 ± 3,9	35,6 ± 4,8	32,2 ± 4,5	32,4 ± 3,3
Hippokampus	40,1 ± 4,1 §	43,6 ± 3,4	37,7 ± 5,0	45,2 ± 4,3

**Tab. 2** Spezifische Aktivität der Citratsynthase in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW ± SEM, \* $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe, § $p < 0,05$  im Vergleich zum Kortex.  
170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, KG = Körpergewicht.

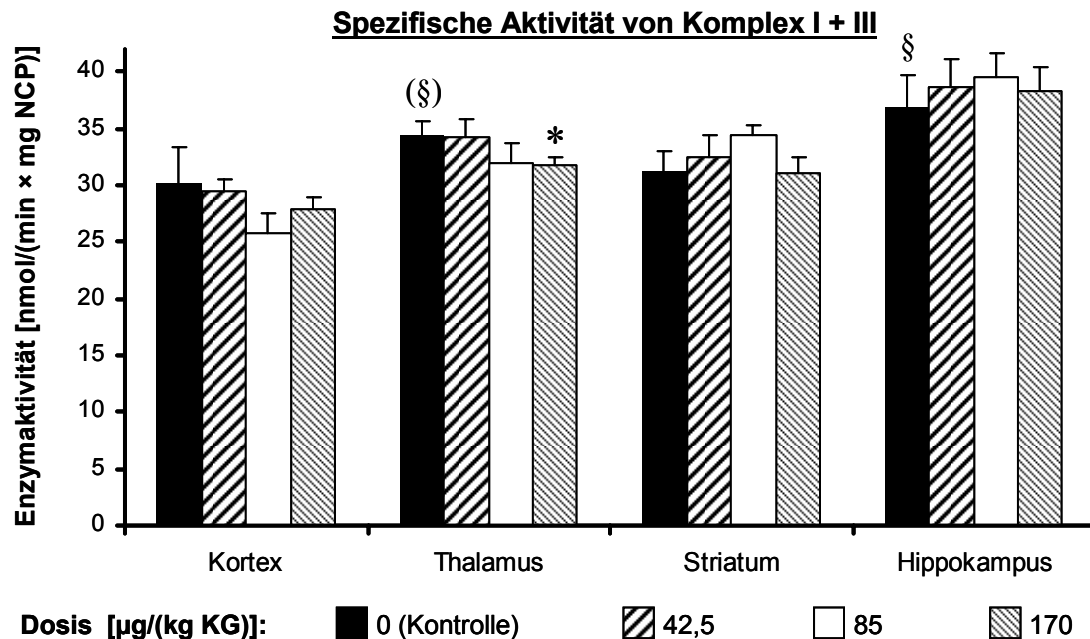


## 4.1.2 Glukokortikoideffekte auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette

### 4.1.2.1 NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III)

Die spezifische Enzymaktivität der Antimycin-A-sensitiven Fraktion der NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III) unterschied sich zwischen den Hirnregionen (Abb. 4). Im Vergleich zum Kortex zeigte sich im Thalamus eine tendenziell höhere spezifische Aktivität. Im Hippokampus war die spezifische Aktivität von Komplex I + III um ca. 22 % höher als im Kortex ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu war sowohl die CS- als auch die SDH-normierte Aktivität von Komplex I + III in Thalamus, Striatum oder Hippokampus tendenziell niedriger als im zerebralen Kortex (Abb. 5). Die SDH-normierte Aktivität von Komplex I + III im Thalamus war mit ca. 24 % sogar signifikant niedriger als im Kortex ( $p < 0,05$ ; Abb. 5). Die spezifische Aktivität von Komplex I + III war im Thalamus und im Hippokampus wahrscheinlich höher als im Kortex, da dort auch der Mitochondriengehalt höher war (s. Kap. 4.1.1.2). Die, verglichen mit dem Kortex, tendenziell niedrigen CS- und SDH-normierten Aktivitäten im Thalamus und im Hippokampus deuten auf eine höhere intrinsische Enzymaktivität von Komplex I + III in den Mitochondrien des Kortex hin.

Die spezifische Aktivität von Komplex I + III zeigte nach Betamethasonbehandlung in allen untersuchten Hirnregionen kaum Änderungen. Lediglich im Thalamus nahm die spezifische Aktivität von Komplex I + III um ca. 8 % unter einer Dosis von 170  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM ab ( $p < 0,05$ ; Abb. 4). Im Kortex war mit zunehmender Betamethasondosis eine Tendenz zur Abnahme der spezifischen Enzymaktivität von Komplex I + III zu beobachten.



**Abb. 4** Spezifische Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

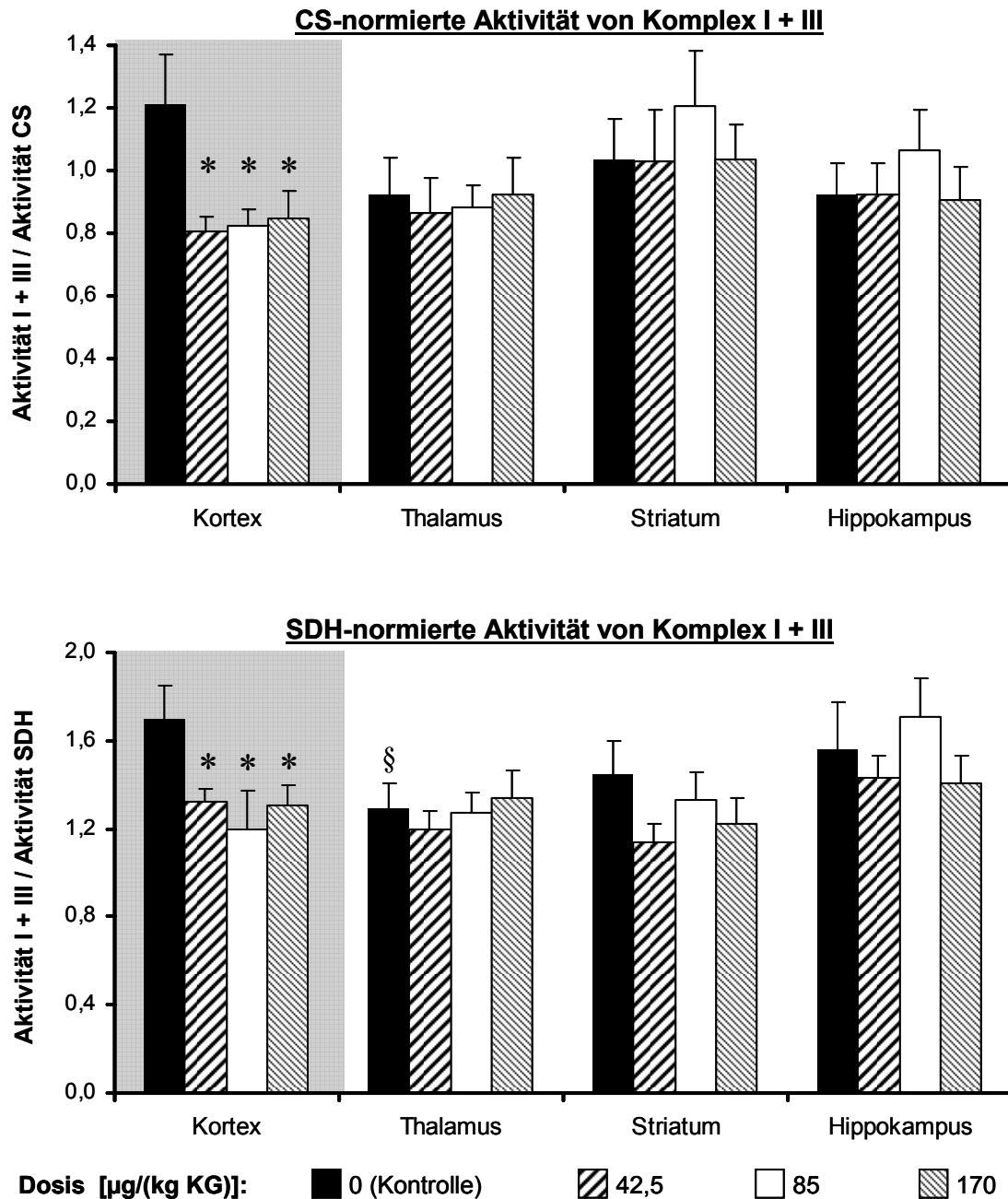
MW  $\pm$  SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe, §p < 0,05 und (§)p < 0,07 im Vergleich zum Kortex.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifeung verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, KG = Körpergewicht.

Nach Normierung auf die Aktivität der Citratsynthase, d. h. auf den Mitochondriengehalt der Proben, war eine Abnahme der Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III) im zerebralen Kortex um ca. 34 % nach 42,5 µg/(kg KG) BM, um ca. 32 % nach 85 µg/(kg KG) BM und um ca. 30 % nach 170 µg/(kg KG) BM nachzuweisen (p < 0,05; Abb. 5). Die Abnahme der CS-normierten Aktivität von Komplex I + III im zerebralen Kortex war damit unabhängig von der verabreichten Betamethasondosis. Eine Abnahme der CS-normierten Aktivität von Komplex I + III im Thalamus, Striatum oder Hippokampus war nicht nachzuweisen (Abb. 5).

Normiert auf die Aktivität der SDH nahm die Aktivität von Komplex I + III im zerebralen Kortex um ca. 22 % nach 42,5 µg/(kg KG) BM, um ca. 30 % nach 85 µg/(kg KG) BM und um ca. 24 % nach 170 µg/(kg KG) BM ab (p < 0,05; Abb. 5). Wie die Minderung der CS-normierten Aktivität nach Betamethason, war auch die Minderung der SDH-normierten Aktivität von Komplex I + III nach Betamethason von der verabreichten Dosis unabhängig. Für die drei verbliebenen Regionen Thalamus, Striatum und Hippokampus waren solche

Effekte nicht zu beobachten (Abb. 5). Insgesamt imponieren die Abnahmen der CS- und SDH-normierten Aktivitäten von Komplex I + III im Kortex durch ein sehr kongruentes Muster (Abb. 5).



**Abb. 5** Effekt von Betamethason auf die CS-normierte und die SDH-normierte Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex I + III) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

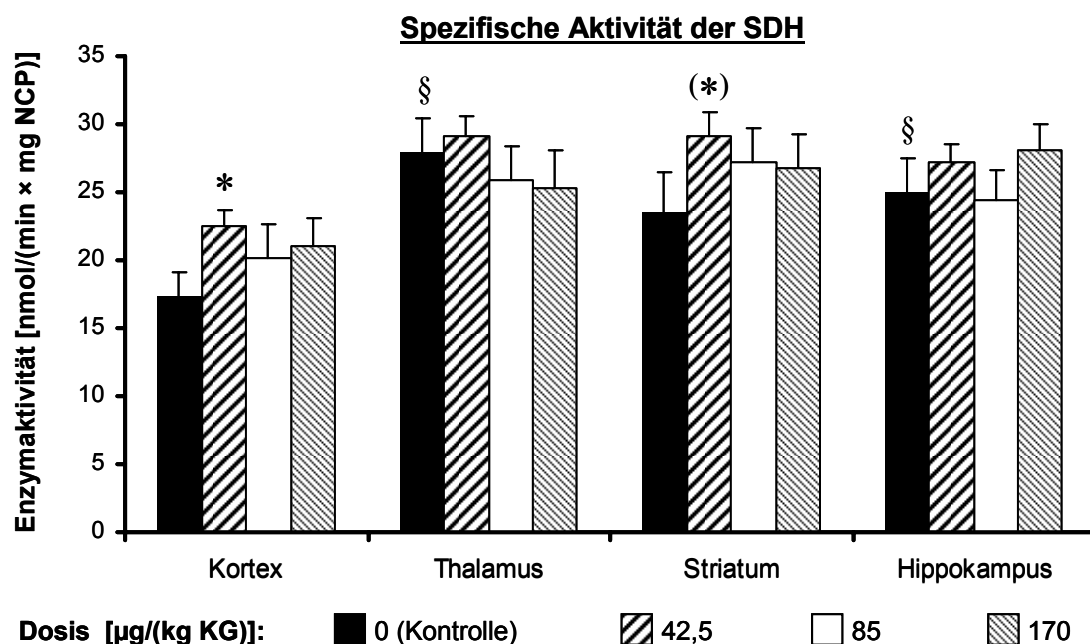
MW  $\pm$  SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe, §p < 0,05 im Vergleich zum Kortex.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht.

#### 4.1.2.2 Succinat-Dehydrogenase (Teil von Komplex II)

Analog den spezifischen Aktivitäten der Citratsynthase, die im Thalamus und im Hippokampus tendenziell höher waren als im zerebralen Kortex (s. Kap. 4.1.1.2), zeigten sich für die Succinat-Dehydrogenase im Thalamus und im Hippokampus ca. 61 % bzw. ca. 44 % höhere spezifische Aktivitäten als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Abb. 6). Die Normierung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität auf den Mitochondriengehalt als CS-normierte Aktivität zeigte keine regionalen Unterschiede (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigen eine starke Korrelation zwischen der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase und dem Mitochondriengehalt, der durch die Messung der spezifischen Aktivität der Citratsynthase bestimmt wurde.

Bis auf eine Zunahme um ca. 30 % nach 42,5  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM im zerebralen Kortex und eine Tendenz zur Zunahme nach 42,5  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM im Striatum blieb die spezifische Aktivität der Succinat-Dehydrogenase von einer Betamethasongabe unbeeinflusst ( $p < 0,05$ ; Abb. 6).

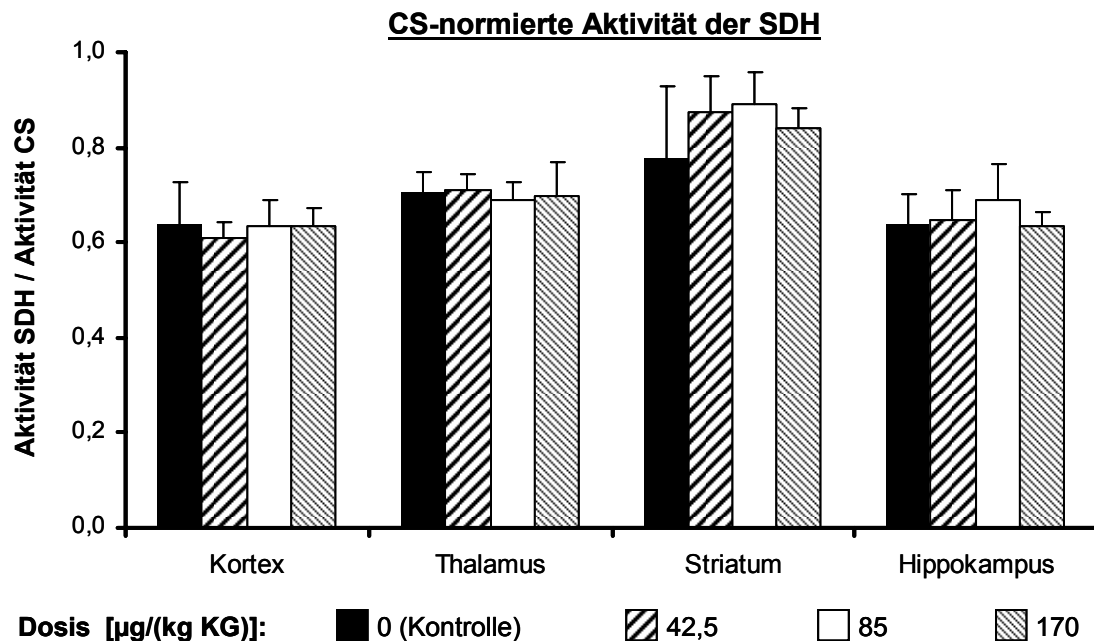


**Abb. 6** Spezifische Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH, Teil von Komplex II) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW  $\pm$  SEM,  $n = 7$  in der Kontrollgruppe und der mit 42,5  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM behandelten Gruppe,  $n = 8$  in den mit 85  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM und 170  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM behandelten Gruppen, \* $p < 0,05$  und (\*) $p < 0,07$  im Vergleich zur Kontrollgruppe, § $p < 0,05$  im Vergleich zum Kortex.

170  $\mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, KG = Körpergewicht.

Die vom Mitochondriengehalt unabhängige CS-normierte Aktivität der Succinat-Dehydrogenase, einem Teil von Komplex II der Atmungskette, zeigte in keiner der vier untersuchten Hirnregionen Änderungen unter einer Betamethasonbehandlung (Abb. 7)



**Abb. 7** CS-normierte Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH, Teil von Komplex II) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

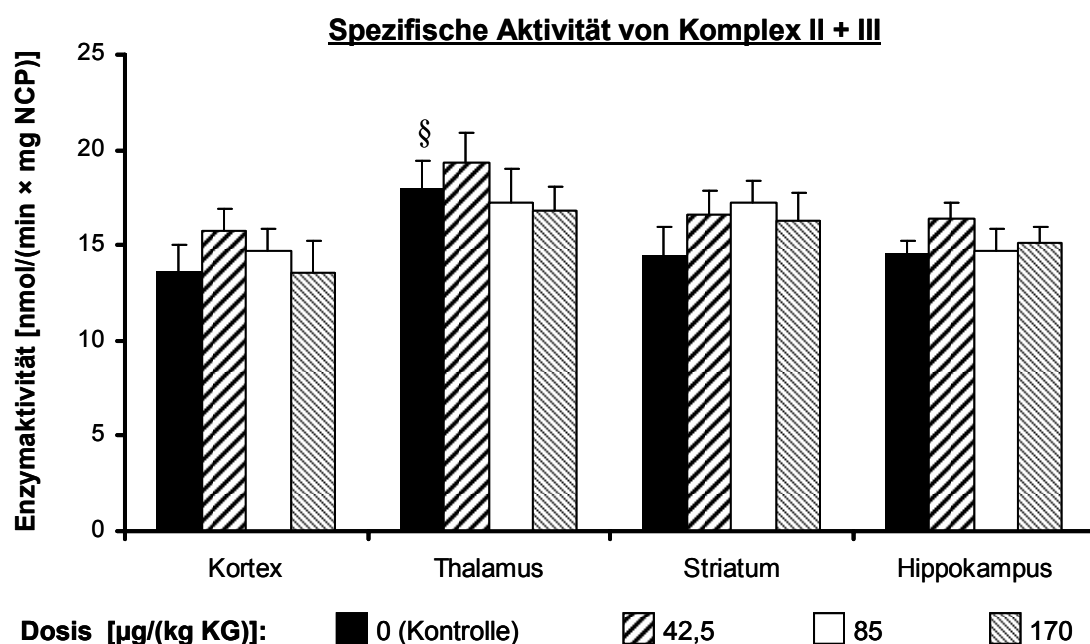
MW ± SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht.

#### 4.1.2.3 Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III)

Die spezifische Aktivität von Komplex II + III war im Thalamus ca. 32 % höher als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Abb. 8). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die CS-normierten Aktivitäten nicht zwischen den Hirnregionen, während die SDH-normierten Aktivitäten im Thalamus ca. 20 % und im Striatum ca. 22 % niedriger waren als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Abb. 9). Die tendenziell niedrigere SDH-normierte Aktivität im Hippokampus war im Vergleich zum Kortex nach Alpha-Adjustierung nicht signifikant. Die intrinsische Aktivität von Komplex II + III scheint daher im Kortex tendenziell höher zu sein als in den anderen drei untersuchten Hirnregionen.

In keiner der vier untersuchten Hirnregionen konnte ein Effekt der Betamethasongabe auf die spezifische Aktivität der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III) nachgewiesen werden (Abb. 8).

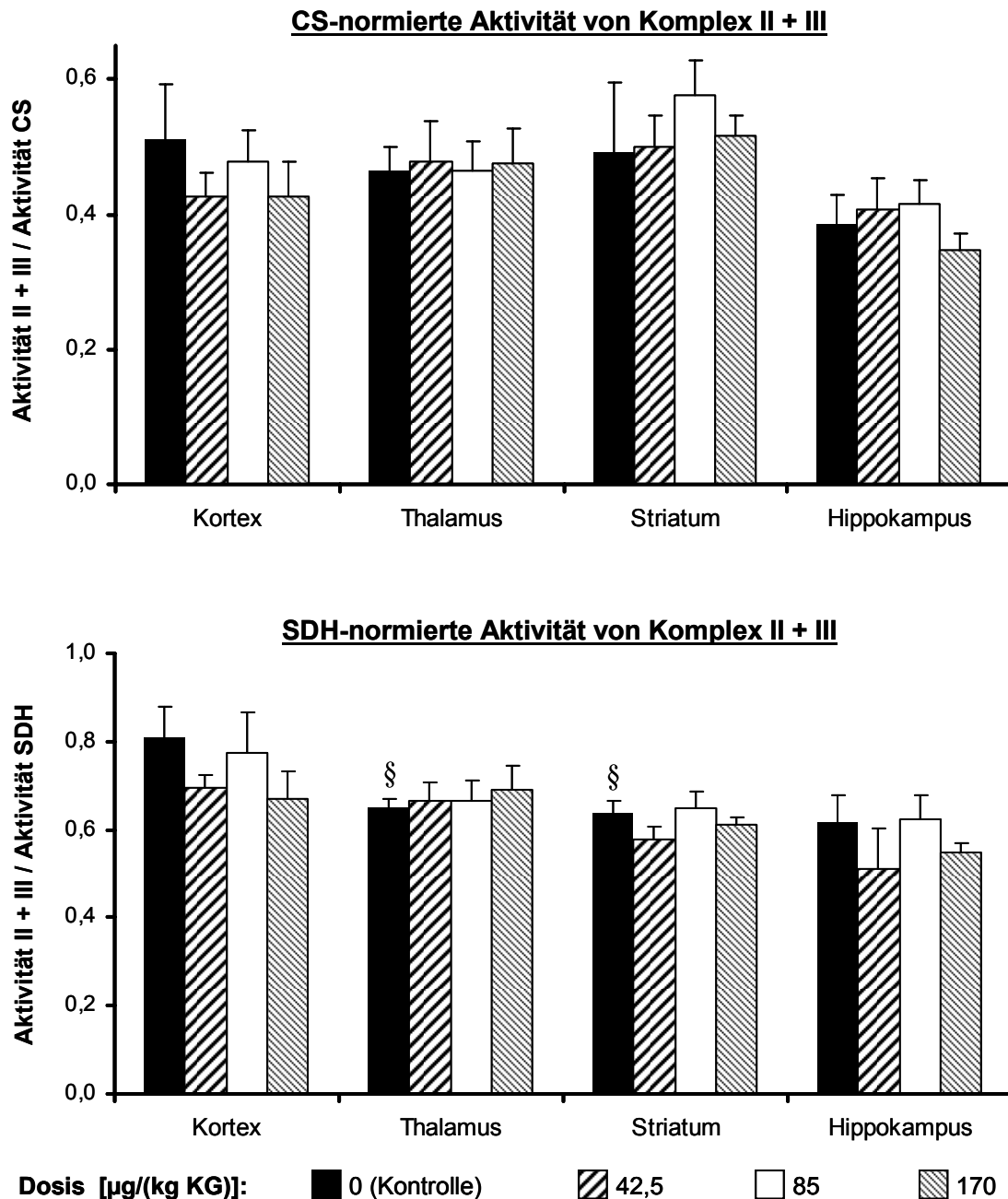


**Abb. 8** Spezifische Aktivität der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW  $\pm$  SEM,  $n = 7$  in der Kontrollgruppe und der mit  $42,5 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM behandelten Gruppe,  $n = 8$  in den mit  $85 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM und  $170 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM behandelten Gruppen,  $^{\S}p < 0,05$  im Vergleich zum Kortex.

$170 \mu\text{g}/(\text{kg KG})$  BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifeung verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, KG = Körpergewicht.

Weder die CS-normierte noch die SDH-normierte Aktivität von Komplex II + III im Kortex waren nach Betamethasongabe verändert (Abb. 9).



**Abb. 9** Effekt von Betamethason auf die CS-normierte und die SDH-normierte Aktivität der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW ± SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe, §p < 0,05 im Vergleich zum Kortex.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht.

#### 4.1.2.4 Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

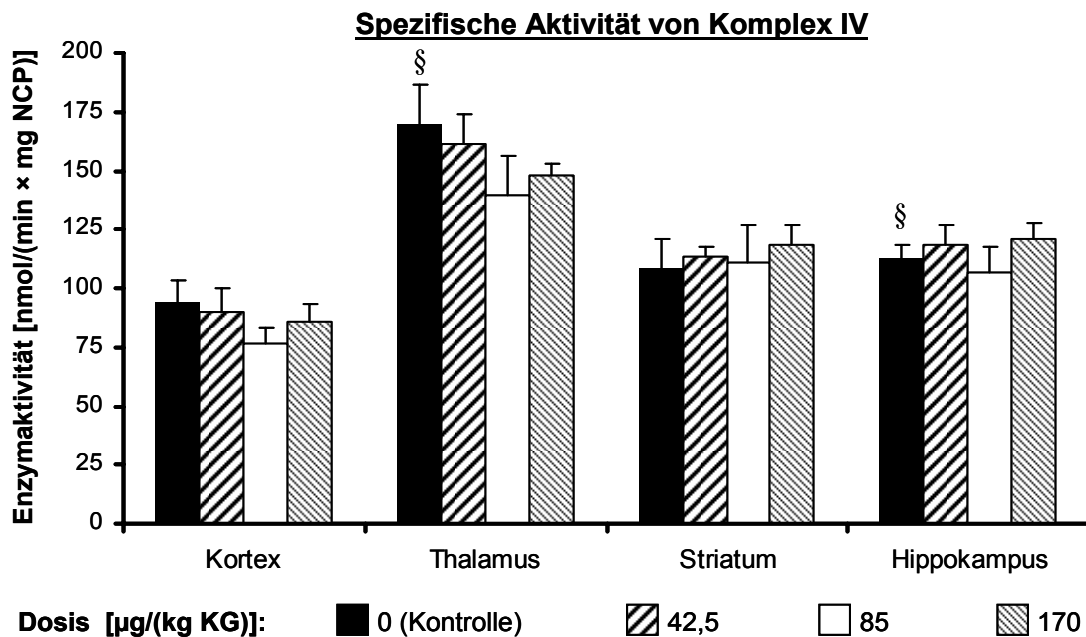
Die spezifische Aktivität der COX (Komplex IV) war, wahrscheinlich aufgrund des höheren Mitochondriengehaltes im Thalamus und Hippokampus (s. Kap. 4.1.1.2), im Thalamus ca. 80 % und im Hippokampus ca. 20 % höher als im zerebralen Kortex ( $p < 0,05$ ; Abb. 10). Die CS- und SDH-normierten Aktivitäten von Komplex IV dagegen zeigten keine Unterschiede zwischen den vier untersuchten Hirnregionen (Abb. 11).

Die Aktivitätsmessungen von Komplex IV ergaben in keiner der vier untersuchten Hirnregionen Änderungen der spezifischen Aktivität nach Betamethason (Abb. 10).

Die Normierung der Aktivität von Komplex IV auf den Mitochondriengehalt der Proben, in Form der CS-normierten Aktivität, offenbarte im zerebralen Kortex eine deutliche Abnahme derselben nach Betamethasongabe. Die Aktivitätsminderung betrug ca. 36 % nach einer Dosis von 42,5 µg/(kg KG) BM, ca. 37 % nach einer Dosis von 85 µg/(kg KG) BM und ca. 36 % nach einer Dosis von 170 µg/(kg KG) BM ( $p < 0,05$ ; Abb. 11).

Durch die SDH-Normierung der Aktivität von Komplex IV wurde die beobachtete Abnahme bestätigt. Sie betrug ca. 26 %, sowohl nach 42,5 µg/(kg KG) BM als auch nach 85 µg/(kg KG) BM, und etwa 28 % nach 170 µg/(kg KG) BM ( $p < 0,05$ ; Abb. 11). Zusätzlich fand sich im Striatum eine ca. 15 %-ige Abnahme der SDH-normierten Aktivität von Komplex IV nach 42,5 µg/(kg KG) BM ( $p < 0,05$ ; Abb. 11).



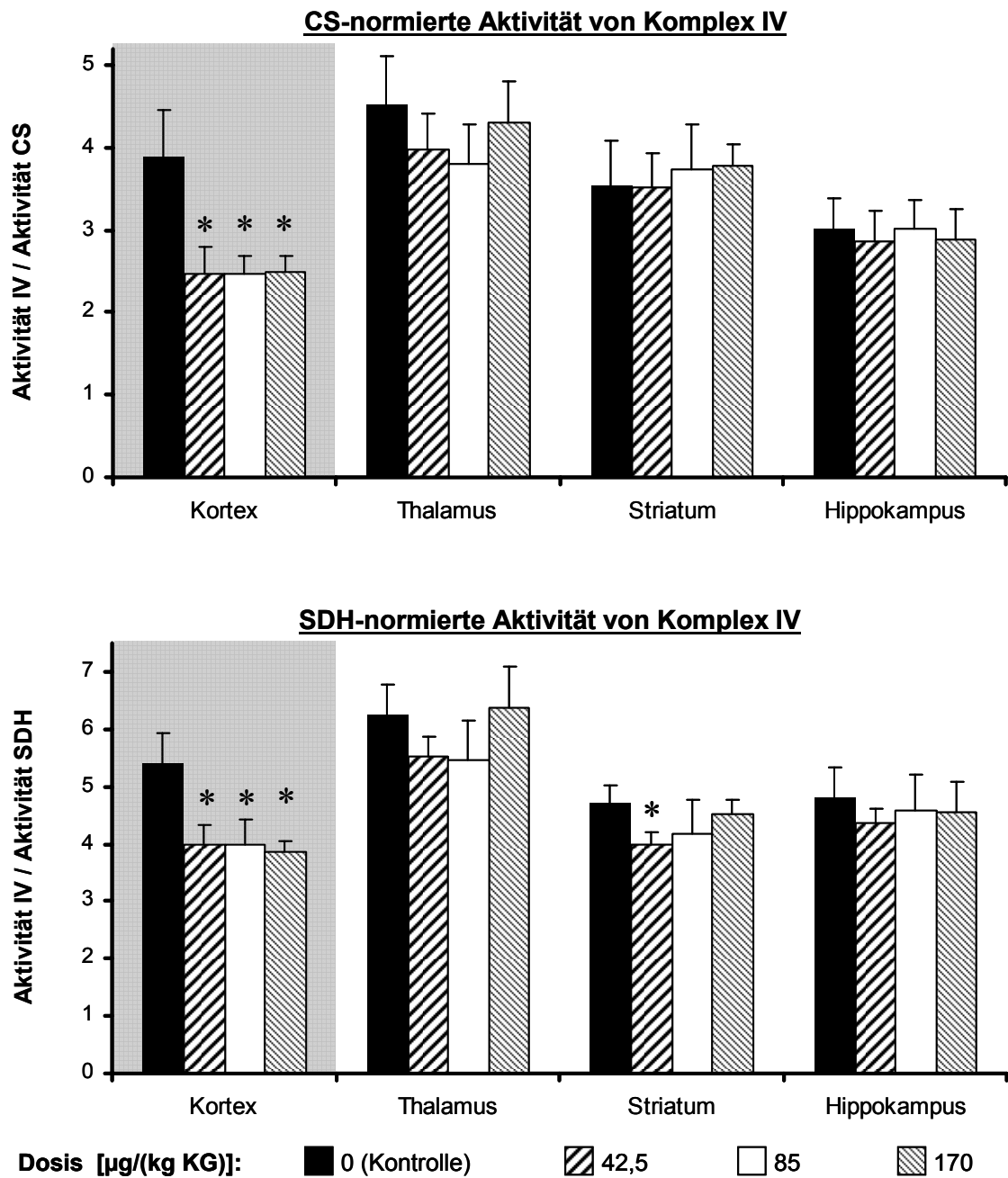


**Abb. 10** Spezifische Aktivität der COX (Komplex IV) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW ± SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe, §p < 0,05 im Vergleich zum Kortex.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreife verwendeten Dosis von 12 mg. NCP = Nichtkollagen-Protein, KG = Körpergewicht.

Somit waren im zerebralen Kortex für Komplex IV die insgesamt größten Abnahmen der Aktivitäten aller Enzymkomplexe der Atmungskette zu verzeichnen. Die beobachteten Aktivitätsminderungen nach Betamethason waren von den verabreichten Dosen unabhängig (Abb. 11). Abgesehen von der oben erwähnten Minderung der SDH-normierten Aktivität von Komplex IV im Striatum nach 42,5 µg/(kg KG) BM, zeigten weder Thalamus, noch Striatum oder Hippokampus Änderungen der CS- bzw. SDH-normierten Aktivitäten von Komplex IV nach Betamethasonbehandlung (Abb. 11). Analog zu den Messungen von Komplex I + III (s. Kap. 4.1.2.1) ergibt sich somit ein für alle vier untersuchten Regionen vergleichbares Muster. Während sowohl die CS- als auch die SDH-normierte Aktivität von Komplex IV eine Abnahme nach Betamethason unabhängig von der verwendeten Dosis selektiv im zerebralen Kortex zeigten (Abb. 11), blieb die spezifische Aktivität auch im Kortex weitgehend unbeeinflusst von einer solchen Behandlung (Abb. 10).



**Abb. 11** Effekt von Betamethason auf die CS-normierte und SDH-normierte Aktivität der COX (Komplex IV) in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

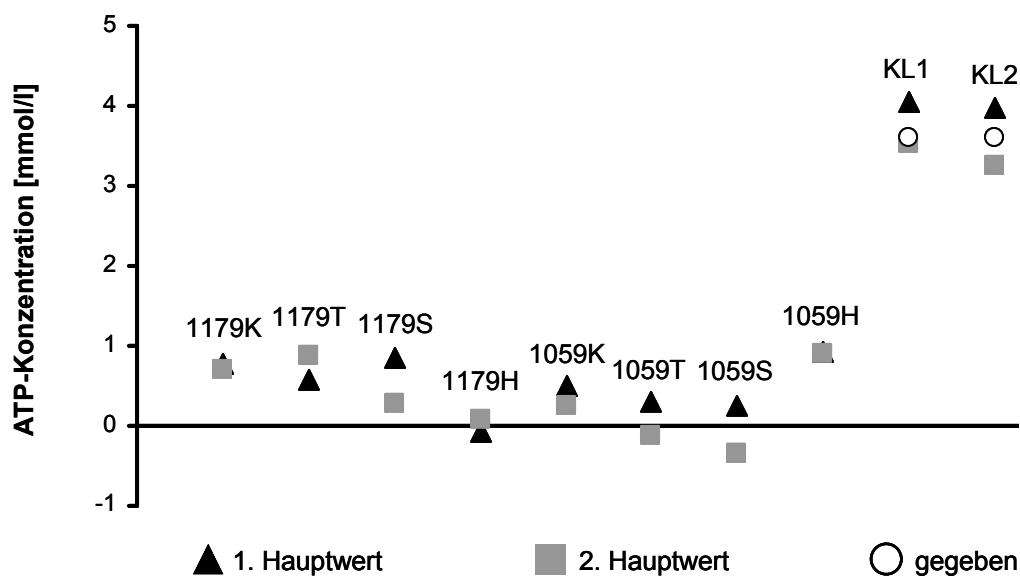
MW  $\pm$  SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifeung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht.

## 4.2 GLUKOKORTIKOIDEFFEKTE AUF DIE KONZENTRATION VON ATP

### 4.2.1 Vorversuche mittels Fluoreszenzspektrometrie

In zahlreichen Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzspektrometrie keine reproduzierbaren Ergebnisse für die Bestimmung von ATP in den vorliegenden Gewebeproben liefern konnte. Am Beispiel einer Messung soll die methodische Grenze der Fluoreszenzspektrometrie bei der Bestimmung von ATP in geringen Konzentrationen verdeutlicht werden. In der Abb. 12 sind die Wertepaare der in Doppelbestimmung gemessenen und anhand einer NADPH/H<sup>+</sup>-Standardkurve berechneten ATP-Konzentrationen von sechs Hirngewebeproben dargestellt. Zusätzlich zu den Wertepaaren der in der gleichen Messung mitbestimmten ATP-Konzentrationen der eigens angefertigten wässrigen Kontrolllösungen (KL1 und KL2), wird außerdem der in den Kontrolllösungen bekannte Gehalt an ATP angegeben (Abb. 12).



**Abb. 12** Mittels Fluoreszenzspektrometrie ermittelte ATP-Konzentrationen von acht Hirngewebeproben und zwei Kontrolllösungen.

Dargestellt sind die Wertepaare der in Doppelbestimmung ermittelten ATP-Konzentrationen (1. und 2. Hauptwert). Die Probenkennung besteht aus einem vierstelligen Zahlencode für jedes Tier und einem der untersuchten Region entsprechenden Großbuchstaben (K = Kortex, T = Thalamus, S = Striatum, H = Hippokampus). KL = Kontrolllösung, FG = Frischgewicht

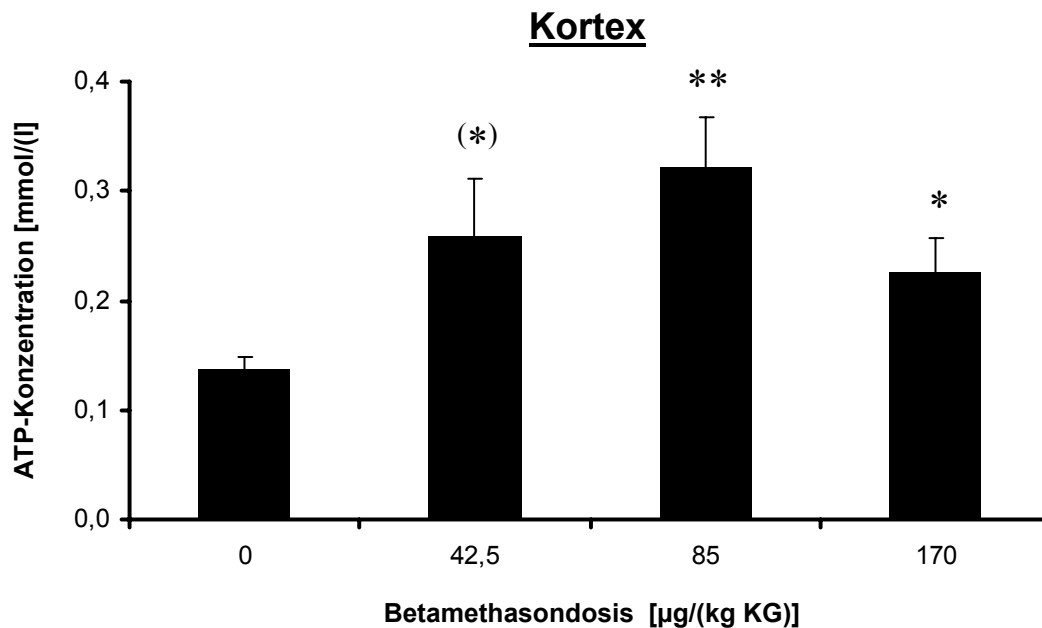
Die ATP-Konzentration in der wässrigen Phase intakter Zellen beträgt normalerweise 2 – 15 mmol/l (Bergmeyer und Bergmeyer 1989). Zur Schaffung eines für den Ablauf der Nachweisreaktion zur Bestimmung von ATP in den zu erwartenden Gewebekonzentrationen

optimalen Reaktionsmilieus wurden die Lösungsbestandteile im Testansatz in den auch von Bauer et al. (1998) beschriebenen Konzentrationen eingesetzt. Der ATP-Gehalt der eigens hergestellten Kontrolllösungen war daher mit 3,61 mmol/l vorgegeben und wurde in der Kontrolllösung 1 mit ca. 3,79 mmol/l und in der Kontrolllösung 2 mit ca. 3,62 mmol/l auch erwartungsgemäß gemessen (Abb. 12). Die Messwerte der ATP-Konzentrationen dagegen lagen mit maximal 0,91 mmol/l (Hirngewebeprobe mit der Probenkennung 1059H) deutlich unterhalb des physiologischen Konzentrationsbereiches von ATP (Abb. 12). Auch die ATP-Konzentrationen in Gewebeproben von Kontrolltieren (Abb. 12: Proben mit den Kennungen 1059K, 1059T, 1059S und 1059H) lagen unter dem physiologischen Grenzwert.

Nicht nur die im Vergleich zum niedrigen Messbereich zum Teil beträchtlichen Differenzen zwischen 1. und 2. Hauptwert weisen auf für diese Konzentrationsbereiche nur schwer reproduzierbare Messergebnisse hin. Auch das Messen von nicht möglichen Negativwerten zeigt an, dass der ATP-Gehalt im Testansatz zu niedrig war, um eine sicher ablaufende Nachweisreaktion zu gewährleisten. Deshalb wurden die Messungen unter erhöhtem Gewebeeinsatz wiederholt, um die ATP-Konzentration im Testansatz zu erhöhen. Die Schwankungen zwischen den Hauptwerten sind sowohl diesem Umstand geschuldet als auch der Entstehung zusätzlicher Fluorochrome, die in Folge von Zerfallsprozessen anfielen, die durch nicht kontrollierbare Temperaturänderungen (auch unterhalb des Gefrierpunkts), bedingt durch Transportwege und -zeiten, angefallen waren. Die, durch diese Zerfallsprozesse entstandenen Fluorochrome führten so zu hohen Blindwerten, die die Restfluorochrome des durch den Zerfall in verminderter Konzentration vorhandenen ATP's überdeckten. Um diesen Störfaktor zu eliminieren fand ein Wechsel der Messtechnik von Fluoreszenz- zu Absorptionsspektrometrie statt (s. Kap. 3.3.4).

#### **4.2.2 Glukokortikoideffekte auf die Konzentration des Energieträgers ATP**

Im zerebralen Kortex nahm die mittels Absorptionsspektrometrie bestimmte ATP-Konzentration nach Betamethasongabe zu (Abb. 13). Zwar konnte mit ca. 88 % ( $p < 0,07$ ) nach einer Dosis von 42,5 µg/(kg KG) BM nur eine Tendenz zur Zunahme gezeigt werden, doch mit einer Zunahme um mehr als das Doppelte (ca. 133 %;  $p < 0,01$ ) nach einer Dosis von 85 µg/(kg KG) BM und mit ca. 64 % ( $p < 0,05$ ) nach einer Dosis von 170 µg/(kg KG) BM war eine Konzentrationssteigerung des ATP nach Betamethason eindeutig nachweisbar. Unterschiede zwischen den ATP-Konzentrationen im zerebralen Kortex der mit drei unterschiedlich hohen Betamethasondosen behandelten Gruppen waren nicht nachweisbar.

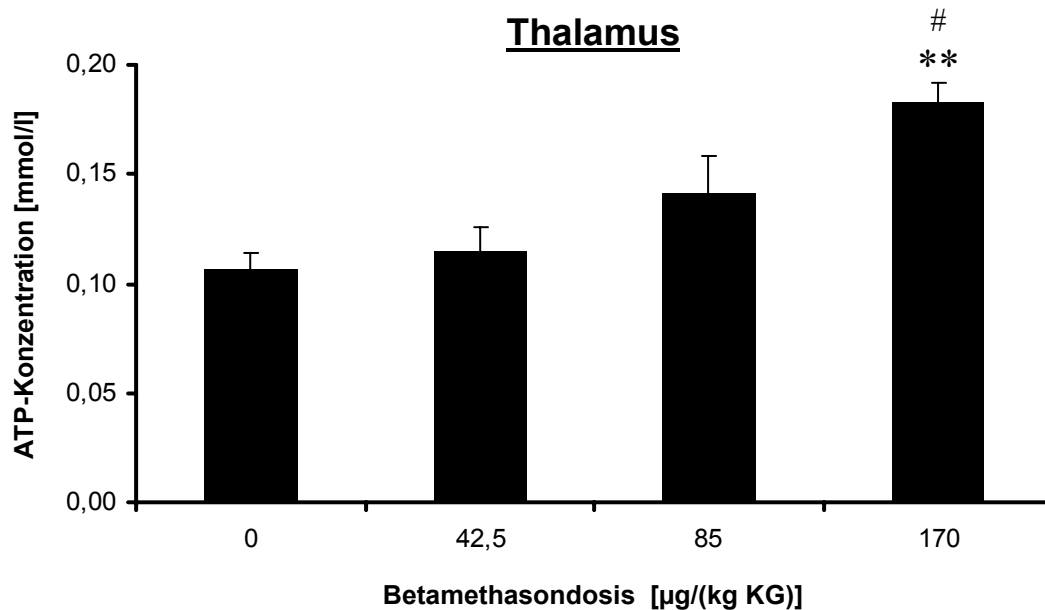


**Abb. 13** Effekt von Betamethason auf die ATP-Konzentration im zerebralen Kortex in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW  $\pm$  SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, (\*)p < 0,07, \*p < 0,05 und \*\*p < 0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht.

Im Thalamus zeigte sich mit 8 % nach einer Dosis von 42,5 µg/(kg KG) BM und 33 % nach einer Dosis von 85 µg/(kg KG) BM eine Tendenz zur Zunahme der ATP-Konzentration nach Betamethasongabe, die nach Gabe von Betamethason in therapeutischer Dosis von 170 µg/(kg KG) BM mit ca. 71 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (p < 0,01) und mit ca. 50 % im Vergleich zu der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe (p < 0,01) nachweislich gegeben war (p < 0,05; Abb. 14).



**Abb. 14** Effekt von Betamethason auf die ATP-Konzentration im Thalamus in Abhängigkeit von der Betamethasondosis (BM).

MW  $\pm$  SEM, n = 7 in der Kontrollgruppe und der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe, n = 8 in den mit 85 µg/(kg KG) BM und 170 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppen, \*\*p < 0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe, #p < 0,01 im Vergleich zu der mit 42,5 µg/(kg KG) BM behandelten Gruppe.

170 µg/(kg KG) BM entspricht der klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung verwendeten Dosis von 12 mg. KG = Körpergewicht

Für das Striatum und den Hippokampus war die absorptionspektrometrische Messung der ATP-Konzentration nicht mehr möglich, da die Masse der zur Verfügung stehenden Proben dieser beiden Hirngeweberegionen einerseits geringer war als die Masse der Hirngewebeproben des zerebralen Kortex und des Thalamus, andererseits die Gewebemasse nach den Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette nicht mehr ausgereicht hätte, um den um das 30-fache erhöhten Gewebeeinsatz (s. Kap. 3.3.2) zu gewährleisten.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 DISKUSSION DER METHODE**

#### **5.1.1 Das fetale Schaf als Tiermodell**

Bereits in den 60er Jahren entdeckte Mount Liggins, dass eine antenatale Glukokortikoidgabe beim fetalen Schaf die Lungenreifung beschleunigt (Liggins 1969). Nur drei Jahre nach den Experimenten am fetalen Schaf konnten Liggins und Howie (1972) in einer kontrollierten, randomisierten klinischen Studie demonstrieren, dass sich die Inzidenz des kindlichen Atemnotsyndroms (RDS) und die perinatale Mortalität durch die antenatale Behandlung mit Betamethason deutlich reduzieren lassen. Seither hat sich das tierexperimentelle Modell des fetalen Schafes bei der Untersuchung zahlreicher weiterer physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen hinsichtlich der menschlichen Fetalperiode bewährt (Nathanielsz 1984) und ist insbesondere mit der Weiterentwicklung der antenatalen Glukokortikoidtherapie zur Induktion der fetalen Lungenreifung bei drohender Frühgeburt untrennbar verbunden.

Die enorme Ähnlichkeit der intrauterinen Entwicklung von Mensch und Schaf erlaubt weit reichende Rückschlüsse auf mögliche Konsequenzen für die Entwicklung des menschlichen fetalen Organismus, auch wenn das Gehirn des Schafes zum Zeitpunkt der Geburt einen etwas höheren Reifegrad aufweist (Astrom 1967, Dobbing und Sands 1979). Ein weiterer großer Vorteil dieses Tiermodells liegt in Größe und Konstitution der Feten, die eine intrauterine Instrumentierung möglich machen.

Grundsätzlich sind Untersuchungen am fetalen Schaf jedoch mit einem hohen zeitlichen, personellen und materiellen Aufwand verbunden, der den Stichprobenumfang der verschiedenen Versuchsgruppen, auch des für diese Arbeit vorliegenden Probenmaterials, begrenzt.

#### **5.1.2 Verwendete Dosierungen von Betamethason**

Die National Institutes of Health (NIH) empfehlen den antenatalen Einsatz synthetischer Glukokortikoide zur Förderung der fetalen Lungenreifung für alle innerhalb der folgenden sieben Tage von einer Frühgeburt bedrohten, schwangeren Frauen zwischen der 24. und der 34. SSW. Die empfohlenen Therapieregimes bestehen aus zwei mal 12 mg Betamethason i.m.

im Abstand von 24 h (NIH 1995). Am Universitäts-Klinikum Jena wird ebenso wie in einigen anderen Kliniken Europas aufgrund der zunehmenden Kenntnisse über die Nebenwirkungen (s. Kap. 1.2.4), die Betamethasondosis geringer bemessen. Eine Behandlung setzt sich hier aus zwei mal 8 mg Betamethason im Abstand von 24 h zusammen. Dosis-Wirkungs-Untersuchungen bezüglich einer minimal wirksamen Dosis der Induktion der Lungenreifung sind nie durchgeführt worden. Die in der Vergangenheit bei einer anhaltenden Bedrohung durch eine Frühgeburt häufig angewendeten, wiederholten Behandlungszyklen mit Glukokortikoiden können aufgrund der oftmals widersprüchlichen Studienlage bezüglich Effektivität und Sicherheit solcher Verfahren nicht empfohlen werden und bleiben daher vorrangig auf klinische Studien zur weiteren Prüfung alternativer Therapieregimes beschränkt (NIH 2000).

Für die vorliegende Studie wurde den Muttertieren gewichtsadaptiert, ausgehend von den Richtlinien der NIH, 170 µg/(kg KG) Betamethason i. m. verabreicht. Dies entspricht der Gabe von 12 mg Betamethason i. m. für eine 70 kg schwere Schwangere, wobei Betamethason in der Klinik allerdings nicht gewichtsadaptiert verabreicht wird. Zusätzlich zur Kontrollgruppe, der stattdessen eine 0,9%-ige NaCl-Lösung verabreicht wurde, wurden unter dem Gesichtspunkt einer möglichen nachweisbaren Dosis-Wirkungs-Beziehung zwei weitere Versuchsgruppen gebildet, denen entweder die Hälfte, also 85 µg/(kg KG) Betamethason, oder ein Viertel, entsprechend 45 µg/(kg KG) Betamethason, statt der vollen Dosis, i. m. appliziert wurde. Die Gabe erfolgte ebenfalls jeweils zweimal im Abstand von 24 h. Eine Erhöhung der Dosis über die in den Empfehlungen der NIH beschriebenen Dosen scheint vor dem Hintergrund potentieller Nebenwirkungen (s. Kap. 1.2.4) wenig sinnvoll (Cavalieri und Cohen 2006, Jobe und Soll 2004, Kavanagh et al. 2006, Roberts und Dalziel 2006).

### **5.1.3 Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette**

#### **5.1.3.1 Methoden zur Beurteilung der Funktion des Systems der oxidativen Phosphorylierung**

Um die Effekte einer antenatalen Betamethasontherapie auf die Funktion der Atmungskette im Hirn fetaler Schafe untersuchen zu können, war ein hinreichend sensitives Verfahren erforderlich, das mit großer Zuverlässigkeit Aktivitätsänderungen der Enzymkomplexe der Atmungskette detektieren kann. Dabei war die Möglichkeit zur genaueren Lokalisation von in ihrer Aktivität beeinflussten Enzymkomplexen innerhalb der Atmungskette wünschenswert.



Dennoch sollte die Methode unkompliziert in der Handhabung sein und so unter verschiedensten Voraussetzungen eine möglichst standardisierte Vorgehensweise bieten, die die Anfälligkeit des Probenmaterials für Störfaktoren bei dessen Verarbeitung und Aufbewahrung im Hinblick auf die zu messenden Größen minimiert.

Es gibt verschiedene Methoden zur Beurteilung der Funktionalität des Systems der oxidativen Phosphorylierung. Die von uns angewandten spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen der Enzymkomplexe der Atmungskette stellen eine sensitive, spezifische und vergleichsweise robuste Methode dar (Chretien und Rustin 2003, Rustin et al. 1994). Sie lassen sich in allen Geweben vornehmen, in denen Mitochondrien vorhanden sind. Alternativ lassen sich auch mittels der oxygraphischen Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, in Abhängigkeit des zu oxidierenden Substrats, an isolierten Mitochondrien Aussagen zur Funktionalität des Systems der oxidativen Phosphorylierung treffen (Rustin et al. 1994).

Die spektrophotometrischen Bestimmungen der Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen, wie sie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen, bieten die Möglichkeit der Detektion und Lokalisation von (betamethasoninduzierten) Funktionseinschränkungen innerhalb der Atmungskette. Bei den Enzymaktivitätsmessungen laufen die Messreaktionen unter Substratsättigung ab. Das bedeutet, dass die Maximalaktivitäten der Enzymkomplexe gemessen werden (s. Kap. 3.2.4). Man muss davon ausgehen, dass die Maximalaktivitäten der meisten Enzymkomplexe der Atmungskette den maximalen Elektronenfluss durch das metabolische System der Atmungskette übersteigen (Mazat et al. 1997). Wenn die Maximalaktivität eines einzelnen Enzymkomplexes die für den maximalen Elektronenfluss durch die Atmungskette benötigte Aktivität übersteigt, hat selbst eine ausgeprägte Minderung der Aktivität des betreffenden Komplexes noch keinen Effekt auf die Elektronenflussrate der Atmungskette, solange die Aktivitätsminderung einen für diesen Komplex spezifischen Schwellenwert nicht übersteigt (Mazat et al. 1997). Das führt dazu, dass nur ausgeprägte Funktionsstörungen einzelner Enzymkomplexe oder die Kombination von Funktionsstörungen verschiedener Enzymkomplexe den Fluss durch die Elektronentransportkette beeinträchtigen. Erst wenn der aus der gesamten mitochondrialen Funktion resultierende O<sub>2</sub>-Verbrauch herabgesetzt ist, sind Funktionsstörungen der Atmungskettenkomplexe auch mit funktionellen Methoden, wie z. B. der oxygraphischen Bestimmung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs an isolierten Mitochondrien, nachweisbar (Gellerich et al. 2004). Aktivitätseinschränkungen, die den für die Beeinträchtigung der gesamten

mitochondrialen Funktion erforderlichen Schwellenwert nicht überschreiten, können mittels Oxygraphie also nicht gefunden werden.

Auf der Suche nach möglichen Einflüssen von Betamethason auf die Funktion des mitochondrialen Systems der Atmungskette bietet die Bestimmung der Enzymkomplexaktivitäten der Atmungskette also ein effektives Screening-Verfahren (Birch-Machin et al. 1994). Wir haben uns daher für die spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen entschieden. Oxygraphische Messungen des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in Abhängigkeit des zu oxidierenden Substrats (Rustin et al. 1994) sind eine sinnvolle Ergänzung, um die funktionellen Auswirkungen von Aktivitätsänderungen der Enzymkomplexe der Atmungskette zu beurteilen. Sie sind aber nur an frischem Gewebe möglich (Chretien und Rustin 2003) und aufgrund ihrer geringeren Sensitivität (Thorburn und Smeitink 2001) zur Klärung der vorliegenden Fragestellung weniger gut geeignet. Um dennoch die funktionelle Bedeutung der Aktivitätsänderungen für den vornehmlich von der Atmungskette geschaffenen Energiegehalt im Gewebe beurteilen zu können, haben wir zusätzlich die ATP-Konzentration im Hirngewebe bestimmt (Kap 5.1.4).

Sowohl für die spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen als auch für die oxygraphische Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ist die vorausgehende Gewinnung und vorbereitende Aufarbeitung der zu untersuchenden Gewebeproben von entscheidender Bedeutung.

#### ***5.1.3.1.1 Methoden der Aufarbeitung des Gewebematerials***

Die spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenkomplexe ist sowohl an isolierten Mitochondrien als auch im unbehandelten Gewebehomogenat möglich. Um die unerwünschte Selektion schadhaft veränderter Mitochondrien zu vermeiden, entschieden wir uns für die Durchführung der Aktivitätsmessungen im unfractionierten Gewebehomogenat. Die in der Vorbereitung für die oxygraphische Messung der mitochondrialen Funktion übliche Isolation der Mitochondrien im Anschluss an die Gewebehomogenisation wird in der Literatur auch für die spektrophotometrische Messung der Enzymkomplexaktivitäten, die wir durchgeführt haben, favorisiert (Chretien et al. 1998, Fischer et al. 1985, Rahman et al. 1999, Rasmussen und Rasmussen 1997, Robinson et al. 1990, Rustin et al. 1994, Scholte et al. 1997, Servidei et al. 1987, Slinde et al. 1975, Willems et al. 1977). Durch die für die mitochondriale Fraktionierung notwendige sequentielle Zentrifugation jedoch können morphologisch abnormale oder schadhafte Mitochondrien selektiert werden und dann für die anschließenden

Aktivitätsmessungen nicht mehr zugänglich sein (Casademont et al. 2004). Eine Aktivitätsminderung der Atmungskette kann über die Beeinträchtigung der mitochondrialen ATP-Produktion zunächst zu einer energetischen Depression der Mitochondrien und dann über die Öffnung der mitochondrialen membranpotentialabhängigen Permeability Transition Pore auch zu einer gestörten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und zu einer mitochondrialen Schwellung sowie zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führen (Bernardi et al. 1994, Halestrap et al. 2000, Halestrap et al. 1998). Daher war nicht auszuschließen, dass die Betamethasongabe über die Hemmung der Atmungskettenkomplexe auch zu einer Änderung der Mitochondrienform und -größe führt und dass es bei der sequentiellen Zentrifugation schließlich zur Selektion der so beeinträchtigten Mitochondrien kommt.

Zudem wurden Subpopulationen von Mitochondrien innerhalb des Zellmilieus von Herzmuskelzellen beschrieben, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Beschaffenheit bei der Isolation durch sequentielle Zentrifugation ebenfalls Selektionsprozessen unterliegen, und auf diese Weise zu einem Zerrbild der zu messenden Größen führen könnten (Fannin et al. 1999, Gallitelli et al. 1999, Lombardi et al. 2000). Auch im Hirngewebe lassen sich unterschiedliche Mitochondrienpopulationen mit charakteristischen Funktionsmustern differenzieren. So kann man z. B. zwischen synaptischen und nicht-synaptischen Mitochondrien unterscheiden, die sich durch fraktionierte Zentrifugation isolieren und voneinander trennen lassen (Brown et al. 2006).

Für Aktivitätsmessungen auf der Suche nach Beeinträchtigungen der Mitochondrienfunktion in vivo, wie in der vorliegenden Studie durch Betamethason, bei denen eine Beeinflussung des Systems der oxidativen Phosphorylierung und damit auch Veränderungen der Form, Größe und Zahl der Mitochondrien nicht auszuschließen sind und von denen alle mitochondrialen Subpopulationen betroffen sein können, ist eine Selektion der Mitochondrien zu vermeiden. Auf diese Weise gehen mögliche pathologisch veränderte, sowie zellanatomisch und -physiologisch verschiedenartig beschaffene Mitochondrien nicht verloren. Messungen in unfraktionierten Gewebehomogenaten, wie wir sie durchgeführt haben, sind daher besser geeignet als Messungen an isolierten Mitochondrien.

Hinzu kommt die nach derzeitigem technischen Kenntnisstand geringe Ausbeute an Mitochondrien nach Isolation, die einen höheren Einsatz an Gewebemenge erforderlich macht (Chretien et al. 1998, Rustin et al. 1994). Besonders in den untersuchten Regionen Hippokampus und Striatum war die Ausbeute des gewonnenen fetalen Hirngewebes dafür teilweise zu gering.

Die Gewebeproben in der vorliegenden Studie wurden direkt nach der Entnahme eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung und Messung bei -80°C gelagert und transportiert. Da eine oxygraphische Messung in zuvor gefrorenem Gewebe nicht durchgeführt werden kann (Chretien und Rustin 2003) und um die beschriebenen möglichen Fehlerquellen, wie die Selektion pathologisch veränderter Mitochondrien durch Isolation, zu eliminieren, fiel die Wahl auf eine spektrophotometrische Messung der Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe im unfraktionierten Homogenat. Dabei sind einige Faktoren zu berücksichtigen, die die Messungen beeinflusst haben könnten.

#### ***5.1.3.1.2 Einflussfaktoren auf die Messergebnisse der Aktivitätsbestimmungen***

Die Verarbeitung von meningealem Bindegewebe sowie weißer Substanz aufgrund der notwendigerweise schnellen Präparation bei der Gewinnung der Hirngewebsproben, um ein schnelles Einfrieren zu ermöglichen, und bei der Homogenisation, um die Kühlkette nicht zu unterbrechen, war trotz großer Sorgfalt nicht auszuschließen. Der Proteingehalt und die Anzahl der zu untersuchenden Mitochondrien in den Homogenaten unterliegen zudem in Abhängigkeit von der untersuchten Hirnregion potentiell Schwankungen, die die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zusätzlich beeinflussen können. Um die Enzymaktivitäten unabhängig vom Proteingehalt der Homogenate darzustellen, wurden die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen auf den nach Lowry bestimmten Proteingehalt des entsprechenden Homogenats normiert und als spezifische Aktivitäten angegeben.

Die Abhängigkeit der Mitochondrienzahl vom tatsächlichen Zellgehalt der Gewebeprobe und die variierende Mitochondriendichte innerhalb des gleichen Gewebes schon in Kontrollpopulationen führen dennoch zu Streuungen der gemessenen spezifischen Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe (Barrientos et al. 1996, Casademont et al. 2004, Chretien et al. 1998, Chretien et al. 1994, Lefai et al. 1995). Dies gilt auch und insbesondere für das Hirngewebe (Benard et al. 2006). Um diese bei Messungen im unfraktionierten Homogenat additiven Schwankungen zu reduzieren, hat sich die Normierung auf die Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Citratsynthase als sinnvoll erwiesen (Barrientos 2002, Casademont et al. 2004, Gellerich et al. 2002, Gellerich et al. 2004, Kramer et al. 2005, Vogel 2001, Wolf und Smeitink 2002). Die Citratsynthase ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Von diesem Enzym ist bekannt, dass es streng mit dem Mitochondriengehalt korreliert (Schwerzmann et al. 1989), was mit dem Gehalt der Gewebe an Atmungskettenenzymproteinen gleichzusetzen ist (Benard et al. 2006). Um Aussagen über die

Enzymaktivitäten unabhängig vom variierenden Mitochondriengehalt der Proben zu treffen und so eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Individuen, also auch Medikamenten- und Kontrollgruppen, zu gewährleisten, haben wir die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe auf die Aktivität der Citratsynthase normiert.

Zusätzlich zu der üblichen Normierung auf die Citratsynthase empfiehlt sich die Darstellung verschiedener Aktivitätsverhältnisse auch von Enzymkomplexaktivitäten der Atmungskette untereinander, um Unterschiede in der Beeinflussung der einzelnen Teile des Systems der oxidativen Phosphorylierung zu verdeutlichen (Barrientos 2002, Chretien et al. 1998, Chretien et al. 1994, de Lonlay et al. 2001). So ist die Succinat-Dehydrogenase als Teil von Komplex II einerseits sowohl am Elektronentransport der Atmungskette als auch andererseits am Abbau von Acetyl-Coenzym A im Citratzyklus beteiligt (s. Kap. 1.3.1). Sie kann, wie auch die Citratsynthase, als Marker für den Mitochondriengehalt verwendet werden (Garcia et al. 1985, Lebrecht et al. 2005, Letellier et al. 2000). Im Gegensatz zur Citratsynthase ist die Succinat-Dehydrogenase zudem ein Teil der Atmungskette. Für uns war von großem Interesse, ob der Einfluss der Betamethasongabe auf die Aktivitäten der Atmungskettenenzyme auf alle beteiligten Enzymkomplexe im gleichen Sinne ausgeübt wird. Der Komplex II nimmt dabei als einziger ausschließlich nukleär kodierter Komplex der Elektronentransportkette eine Sonderstellung ein und eignet sich als Indikator nukleär-genomisch vermittelter Funktionsänderungen der Atmungskette (Li et al. 2001). Daher haben wir eine Normierung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I + III, II + III und IV auf die SDH (als Teil von Komplex II) vorgenommen, um Unterschiede in der Beeinflussung durch Betamethason von rein nukleär kodierten Teilen der Atmungskette einerseits und von Teilen der Atmungskette, deren Polypeptide auch durch das mitochondriale Genom kodiert werden, andererseits zu verdeutlichen. Die Darstellung der Aktivitätsverhältnisse als SDH-normierte Aktivität erlaubte Aussagen zur Selektivität der Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen unter Berücksichtigung der funktionellen Einheit der Atmungskette und ist ein weiterer diagnostischer Hinweis bei der Suche nach selektiven Enzymkomplexdysfunktionen (Chretien et al. 1994, Lebrecht et al. 2005, Rustin et al. 1991). Die Betrachtung der SDH-normierten Aktivität ließ damit Rückschlüsse auf die potentiellen Mechanismen der Betamethasonwirkung, d. h. eine Regulation über nukleär-genomisch oder mitochondrial-genomisch vermittelte Wirkungen, auf die Atmungskette zu (s. Kap. 5.2.3.4.1).

#### 5.1.4 Bestimmung der Konzentration von ATP

Um Aussagen über die biologische Bedeutung des Einflusses von Glukokortikoiden auf die Enzymkomplexe der Atmungskette treffen zu können, sollte im Anschluss an die Aktivitätsmessungen, zur Einschätzung der Konsequenz einer Hemmung der Enzymkomplexe auf die Bereitstellung energiereicher Metabolite, die ATP-Gewebekonzentration in den Regionen zerebraler Kortex, Thalamus, Striatum und Hippokampus des fetalen Hirns bestimmt werden.

Für die enzymatische Bestimmung von ATP waren fluorometrische Tests nach Lowry und Passonneau (1972) vorgesehen (s. Kap. 3.3.3). Sie bieten den Vorteil, bei hinreichender Sensitivität in geringen Gewebemengen anwendbar zu sein, und ermöglichen so die Bestimmung von ATP auch in Gewebeproben von vergleichsweise geringer Masse, wie dem Hirn fetaler Schafe.

Für die Zusammensetzung der Lösungsbestandteile des enzymatischen Testes zur ATP-Bestimmung und um ein optimales Milieu für den Ablauf der Nachweisreaktionen im Testansatz zu schaffen sowie für die Herstellung von Standard- und Kontrolllösungen ist die Kenntnis des Erwartungsbereiches, in dem ATP gemessen werden soll, grundlegend. Da, nach unseren Recherchen, bisher der ATP-Gehalt im Hirn fetaler Schafe noch nicht untersucht wurde, sind wir von Konzentrationsbereichen ausgegangen, die im reifen sowie im sich entwickelnden Hirngewebe anderer Spezies, wie fetalen, neugeborenen und adulten Ratten, Hunden und Schweinen gemessen worden sind (Bauer et al. 1998, Tuor et al. 1995, Tuor und Del Bigio 1996, Tuor et al. 1993, Tuor et al. 1997, Vannucci et al. 1996, Vannucci et al. 1997, Vannucci et al. 1989, Vannucci und Duffy 1974, Vannucci und Duffy 1976, Vannucci et al. 1980, Vannucci et al. 1981, Vannucci et al. 2004, Vannucci und Vannucci 1978, Vannucci et al. 1987, Vannucci und Wolf 1977, Vannucci et al. 1978, Vannucci et al. 1994, Yager 2004, Yager et al. 2002, Yager und Asselin 1996, Yager et al. 1992b, Yager et al. 1992a, Yager et al. 1994, Yager et al. 1996).

Die in umfangreichen Vorversuchen erzielten Ergebnisse des zu untersuchenden Gewebematerials waren jedoch nicht reproduzierbar (s. Kap. 4.2.1). Die im Ergebnisstil gezeigten Unsicherheiten und Schwankungen bei der fluorometrischen ATP-Bestimmung im Hirngewebe ließen vermuten, dass durch nicht kontrollierte Zerfallsprozesse in den Proben Fluorochrome in unregelmäßig hohen Konzentrationen entstanden waren (s. Kap. 5.2.4). Die dadurch gemessenen Blindwerte waren mitunter so hoch, dass sie die in der Nachweisreaktion gebildeten Restfluorochrome des nunmehr in verringerter Konzentration vorhandenen ATP in

der Messung überlagerten. Daher wurden die Proben nun mittels Absorptionsspektrometrie (Bergmeyer und Bergmeyer 1989) auf einen wesentlich geringeren ATP-Gehalt überprüft. Gegenüber der Fluoreszenzspektrometrie bietet die Absorptionsspektrometrie den Vorteil weniger anfällig gegen mögliche Störgrößen zu sein, da der Reaktionsschritt von in der Nachweisreaktion gebildetem NADPH zu Fluorochrom entfällt. Allerdings erfordert die Absorptionsspektrometrie ein höheres Testansatzvolumen und damit einen höheren Einsatz an Gewebeproben und Material, wie z. B. Enzymlösungen.

Damit auch bei geringen ATP-Konzentrationen die Messreaktion sicher ablaufen konnte, wurde außerdem der Einsatz an Gewebe pro Testansatzvolumen erhöht (s. Kap. 3.3.4). Der enorme Mehraufwand an Gewebe führte dazu, dass für die Bestimmung von ATP mittels Absorptionsspektrometrie nur die Proben aus Kortex und Thalamus genügend Masse liefern konnten. In Striatum und Hippokampus war eine Bestimmung des ATP-Gehalts aufgrund der geringen Masse der Gewebeproben nicht mehr möglich.

## **5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE**

### **5.2.1 Plausibilität der gemessenen Enzymaktivitäten**

Im Vergleich zu Aktivitätsmessungen von Atmungskettenkomplexen und Citratsynthase im Homogenat vom Hirngewebe von Ratten und Mäusen (Kunz et al. 1999, Marin-Garcia et al. 1996, Martin et al. 2002) sowie im Vergleich zu Aktivitätsmessungen im Homogenat von humanem Skelettmuskel-, Herzmuskel-, Lebergewebe und Lymphozyten (Casademont et al. 2004, Chretien et al. 1994) ließ sich feststellen, dass die Absolutwerte aller von uns gemessenen spezifischen Aktivitäten im nanomolaren Bereich lagen und somit plausibel waren. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten waren denen im humanen adulten Hirngewebe insgesamt sehr ähnlich (Mann et al. 1992, Maurer et al. 2001, Maurer et al. 2000). Im Homogenat vom Hirngewebe von Schafen sind derlei Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe, nach unserer Kenntnis, bisher noch nicht vorgenommen worden. Die Ähnlichkeiten der von uns gemessenen Werte zu denen im adulten humanen Gehirn - trotz der artspezifischen Unterschiede von Mitochondrien- und Enzymgehalt sowie der einzelnen Enzymaktivitäten (Benard et al. 2006) und trotz der entwicklungsabhängigen Veränderungen der Enzymaktivitäten auch im Hirngewebe (Erecinska et al. 2004) - zeigen die Relevanz des vorliegenden Modells für den Menschen.

### **5.2.2 Regionale Unterschiede von Proteingehalt, Mitochondriengehalt und Enzymaktivitäten**

#### Proteingehalt der Hirnregionen

Von den vier untersuchten Regionen zerebraler Kortex, Thalamus, Striatum und Hippokampus zeigte sich im zerebralen Kortex der niedrigste nach Lowry bestimmte Gehalt an nicht-kollagenem Protein. Da mit der Reifung des Gehirns dessen Wassergehalt abnimmt (Agrawal et al. 1968), lassen sich regionale Unterschiede im Proteingehalt durch das phylogenetische Alter der Hirnregionen und dem damit verbundenen regional abhängigen Eintritt der Reifungsstadien erklären. Prinzipiell erfolgt die Reifung phylogenetisch junger Hirnregionen später als die Reifung phylogenetisch älterer Hirnregionen (Erecinska et al. 2004). Dies kann erklären, dass der zerebrale Kortex, als Teil des Neokortex die phylogenetisch jüngste der vier untersuchten Hirnregionen, den höchsten Wassergehalt und damit den niedrigsten Proteingehalt aufweist.

#### Mitochondriengehalt der Hirnregionen

Auch die spezifische Aktivität des mitochondrialen Markers Citratsynthase zeigte regionale Unterschiede, die denen des Proteingehaltes ähnlich waren. Im Vergleich zwischen den Kontrollgruppen der vier untersuchten Hirnregionen war der Mitochondriengehalt, der durch die spezifische Aktivität des mitochondrialen Matrixenzyms Citratsynthase bestimmt werden konnte (Benard et al. 2006), im zerebralen Kortex am niedrigsten. Wie der vergleichsweise niedrige Proteingehalt lässt sich der niedrige Mitochondriengehalt durch einen höheren Wassergehalt des im Vergleich mit den phylogenetisch älteren Hirnregionen noch unreifen kortikalen Gewebes erklären (s.o.). Zudem erfolgt auch die Entwicklung der Enzymausstattung in den Hirnregionen entsprechend der Reihenfolge von phylogenetisch ältester zu phylogenetisch jüngster Region (Leong und Clark 1984b, Leong und Clark 1984a). Bezüglich der Korrelation von Citratsynthaseaktivität und Mitochondriengehalt wie sie im adulten Gehirn nachgewiesen worden ist (Schwerzmann et al. 1989), muss für das sich entwickelnde Gehirn wahrscheinlich einschränkend berücksichtigt werden, dass sich bei konstanter Größe auch die subzelluläre Struktur der Mitochondrien entwickelt (Zunahme des Volumens und der Zahl der Cristae), was zu einer Zunahme der ATP-Synthese-Kapazität der Mitochondrien führt. Im Allgemeinen nehmen die Aktivitäten auch anderer an der ATP-Produktion beteiligten Enzyme mit dem Fortschreiten der Hirnentwicklung zu. Das wird vorrangig auf den mit der Entwicklung zunehmenden ATP-Verbrauch - der durch die



Entwicklung der energieaufwändigen Ionenpumpen im Zusammenhang mit der zunehmenden, vom Erhalt des neuronalen Membranpotentials abhängigen elektrischen Hirnfunktion steigt - zurückgeführt wird (Erecinska et al. 2004). Das trifft nicht nur für die Enzyme der Glykolyse, der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und des Citratzyklus, dessen Bestandteil die Citratsynthase ist, sondern auch für die Enzymkomplexe der Atmungskette zu (Almeida et al. 1995, Bates et al. 1994, Mjaatvedt und Wong-Riley 1988, Wilson 1972).

Insgesamt scheint die für die Korrelation von CS-Aktivität und Mitochondriengehalt störende Zunahme der Enzymkapazitäten unabhängig von der Zahl der Mitochondrien keinen prinzipiellen Einfluß auf die Korrelation zu haben, da wie der Mitochondriengehalt auch der Proteingehalt im zerebralen Kortex als Ausdruck der relativen Unreife niedriger war.

#### Aktivität der Atmungskomplexe in den verschiedenen Hirnregionen

Die spezifischen Aktivitäten aller Atmungskettenkomplexe waren ebenfalls im zerebralen Kortex niedriger als im Thalamus und Hippokampus. Im Gegensatz dazu zeigten die CS-normierten Aktivitäten keine regionalen Unterschiede, was auf eine vergleichbare Ausstattung der Mitochondrien mit Atmungskettenkomplexen in allen vier untersuchten Hirnregionen hindeutet. Die regionalen Unterschiede der vom Mitochondriengehalt abhängigen spezifischen Aktivitäten der gleichen Atmungskettenkomplexe sind demnach vorrangig durch die Unterschiede im Mitochondriengehalt verursacht. Der vergleichsweise niedrige Mitochondriengehalt im zerebralen Kortex wiederum ist Ausdruck der geringeren Reife dieser Region (Erecinska et al. 2004) und der generell gewebe- und regionalspezifischen Ausstattung mit Mitochondrien und Enzymen des Energiestoffwechsels (Benard et al. 2006).

### **5.2.3 Glukokortikoideffekte auf die mitochondriale Aktivität**

#### **5.2.3.1 Überblick über die Effekte**

Mit Hilfe von Aktivitätsbestimmungen der Enzymkomplexe der Atmungskette gelang es uns, zum ersten Mal Einblick in die Verhältnisse des mitochondrialen Energiestoffwechsels im Hirn fetaler Schafe nach antenataler Behandlung mit Glukokortikoiden zu nehmen und einen hemmenden Einfluss einer solchen Therapie auf die Enzymkomplexe der Atmungskette nachzuweisen. Nach unserer Kenntnis gab es bisher weder *in vitro* noch *in vivo* Untersuchungen zu den Wirkungen von Glukokortikoiden auf die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe im fetalen Hirngewebe. Die wenigen bekannten Daten zum Einfluss von Glukokortikoiden auf die mitochondriale Reifung und Funktion im sich entwickelnden

Hirn stammen vorrangig aus Experimenten an Klein- und Nagetieren, wie Ratten und Mäusen (Katyare et al. 2003, Pandya et al. 2007). Nur selten fanden die Studien am fetalen Hirngewebe statt (Nakai et al. 2002). Häufiger wurden die Experimente in der postnatalen Phase des sich entwickelnden Rattenhirns durchgeführt. Zudem handelt es sich entweder um die histochemische Charakterisierung der COX (Komplex IV) im Hirngewebe (Nakao et al. 1998, Tai et al. 1995) oder um die oxygraphische Bestimmung der mitochondrialen Gesamtfunktion ohne Aktivitätsmessungen einzelner Komplexe der Atmungskette (Katyare et al. 2003, Nakai et al. 2000, Pandya et al. 2007).

Da die gleiche Betamethasonkonzentration verwendet wurde, wie sie auch in der Klinik zur Induktion der fetalen Lungenreifung routinemäßig eingesetzt wird, und da diese Therapie am Schaf entwickelt wurde, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von klinischer Relevanz. Der besondere Wert liegt in der, unseres Wissens nach, erstmaligen Bestimmung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe im sich entwickelnden gyrierten Gehirn während der Fetalperiode.

Die Behandlung trächtiger Schafe mit Betamethason, entsprechend den Empfehlungen der NIH (1995) zur antenatalen Behandlung mit Glukokortikoiden zur Induktion der fetalen Lungenreifung, führte im zerebralen Kortex der untersuchten Feten, im Vergleich zu den Kontrolltieren, zu einer dosisunabhängigen Minderung der Aktivitäten der NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex I + III) und der COX (Komplex IV) im zerebralen Kortex, d.h. die Hälfte und ein Viertel der therapeutisch verwendeten Betamethasondosis hatten den gleichen Effekt wie die klinisch verwendete Dosis. Die Betamethasongabe hatte keinen Einfluss auf die Aktivitäten der Succinat-Dehydrogenase (Teil von Komplex II) und der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III). Die Minderungen der Aktivitäten von Komplex I + III und Komplex IV im zerebralen Kortex ohne Minderungen der Aktivitäten von Succinat-Dehydrogenase (Teil von Komplex II) und Komplex II + III ließ auf eine dosisunabhängige spezifische Hemmung der Komplexe I und IV schließen. Die Effekte sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

### **5.2.3.2 Glukokortikoideffekte auf die Bezugsgrößen Protein- und Mitochondriengehalt**

#### Proteingehalt

Der nach Lowry im Homogenat bestimmte Gehalt an nicht-kollagenem Protein (NCP) war von der Betamethasongabe weitgehend unbeeinflusst. Es gab zwar Tendenzen zur Zunahme in allen Hirnregionen mit steigender Betamethasondosis, Signifikanz konnte aber nur nach

höchster Dosis im Thalamus nachgewiesen werden. Aufgrund der relativ kurzen Betamethasonbehandlung über 48 h ist die Zunahme des Proteingehalts wahrscheinlich eher Ausdruck einer Abnahme des Wassergehaltes. Die Abnahme des zerebralen Wassergehaltes durch synthetische Glukokortikoide wie Betamethason wird sich klinisch bei der Hirnödemtherapie zunutze gemacht (Kaal und Vecht 2004). Ein positiver Effekt auf die Proteinsynthese ist unwahrscheinlich, da zu den potentiell katabolen Betamethasonwirkungen auch die verminderte Synthese und der erhöhte Abbau von Proteinen zählen (Bowes et al. 1996, Max et al. 1988, Odedra et al. 1983). So war im fetalen Schafgehirn kein Effekt der antenatalen Glukokortikoidgabe auf die Proteinsynthese nachweisbar (McCallum et al. 2008) und sogar eine Abnahme des Gehaltes an High-Turnover-Proteinen zu beobachten (Antonow-Schlorke et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2003, Schwab et al. 2001b).

#### Mitochondriengehalt

Um die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette unabhängig vom Mitochondriengehalt darstellen zu können, mussten wir diesen zunächst über die Messung der Aktivität der Citratsynthase bestimmen. Zusätzlich konnten über die Bestimmung der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase Aussagen zum Mitochondriengehalt gemacht werden (s. Kap. 5.1.3.1.2).

Dabei zeigte die Zunahme der spezifischen Aktivität der Citratsynthase und der Succinat-Dehydrogenase im zerebralen Kortex nach der Gabe von Betamethason in der niedrigsten Dosierung eine Zunahme des Mitochondriengehaltes. In den drei anderen untersuchten Regionen Thalamus, Striatum und Hippokampus blieb der Mitochondriengehalt von der Betamethasongabe gänzlich unbeeinflusst.

Die Zunahme des Mitochondriengehaltes nach Betamethasongabe zeigt den potentiellen Einfluss von Glukokortikoiden auf die mitochondriale Biogenese und Reifung im fetalen Gehirn. Eine Zunahme der mitochondrialen Atmung durch Dexamethason wurde schon im fetalen Rattenhirn durch die oxygraphisch gemessene Zunahme der mitochondrialen Atmungsrate gezeigt (Nakai et al. 2002). Diese Studie konnte jedoch keine Aussagen zur regionalspezifischen Glukokortikoidwirkung auf die mitochondriale Reifung machen. Zuvor hatten dieselben Autoren Änderungen der mitochondrialen Aktivität im Hirn von fetalen und neonatalen Ratten in Abhängigkeit vom Alter und Entwicklungsstand der Tiere beschrieben (Nakai et al. 2000).

Die von uns beobachtete Zunahme des Mitochondriengehaltes nach Betamethason selektiv im zerebralen Kortex ist möglicherweise dadurch begründet, dass die Reifung des zerebralen

Kortex später als die der drei anderen untersuchten Regionen Thalamus, Striatum und Hippokampus erfolgt (Erecinska et al. 2004). Dies würde implizieren, dass insbesondere unreife Hirnregionen sensibel für Glukokortikoidwirkungen auf die Mitochondrien und die Enzyme der Atmungskette sind. Tatsächlich zeigte sich im unreifen Gehirn von Ratten ein stimulierender Effekt von Glukokortikoiden auf die oxygraphisch ermittelten Atmungsraten isolierter Mitochondrien und die Aktivität der SDH als Marker für den Mitochondriengehalt, während die Glukokortikoidgabe im reifen Gehirn keinen Effekt auf die Mitochondrien hatte oder sogar zur Hemmung ihrer Funktion und der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase führte (Katyare et al. 2003, Pandya et al. 2007). Die mitochondrialen Atmungsraten und die Aktivität der SDH verhielten sich in diesen Studien nicht immer gleichsinnig, so dass ein Glukokortikoideffekt auch auf andere Enzyme der Atmungskette zu vermuten ist. Insgesamt zeigte sich in diesen Studien die Abhängigkeit der Glukokortikoideffekte auf die mitochondriale Funktion und die Aktivität mitochondrialer Enzyme vom Reifungsgrad des Gehirns. Aussagen zu regionalen Unterschieden der Glukokortikoideffekte auf die mitochondriale Reifung in Abhängigkeit vom Reifungsgrad der Hirnregion wurden dabei nicht getroffen. Um diesen Sachverhalt endgültig klären zu können, müssten in einer anderen Studie die Glukokortikoidwirkungen auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand verschiedener fetaler Hirnregionen untersucht werden. Möglicherweise ist die Zunahme des Mitochondriengehaltes als Kompensationsreaktion auf die Hemmung der Atmungskettenkomplexe I und IV durch Betamethason im zerebralen Kortex zu verstehen. Bei Mitochondriopathiepatienten ist die Kompensation aktivitätsgeminderter defekter Atmungskettenkomplexe durch die Erhöhung des Mitochondriengehaltes bereits gezeigt wurden (Gellerich et al. 2002). Warum die Zunahme der CS-Aktivität im zerebralen Kortex nur nach der geringsten verabreichten Betamethasondosis auftrat, lässt sich allerdings nicht erklären. Möglicherweise gibt es unter den höheren Dosierungen zusätzliche Effekte der Glukokortikoide, z. B. eine Hemmung des Proteinsyntheseapparates durch katabole Wirkungen (Bowes et al. 1996, Max et al. 1988, Odedra et al. 1983), die der Zunahme der Aktivitäten der Citratsynthase und der Succinat-Dehydrogenase zuwiderlaufen. Unter der klinisch angewandten Routinemedikation trat jedenfalls in keiner der vier untersuchten Hirnregionen eine Zunahme des Mitochondriengehaltes auf.

### 5.2.3.3 Glukokortikoideffekte auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette

#### Spezifische Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe

Die spezifische Aktivität von Komplex I + III im Thalamus nahm mit der höchsten Betamethasondosis ab. Dagegen nahm die spezifische Aktivität der SDH (Teil von Komplex II), wie schon erwähnt, nach der geringsten verabreichten Betamethasondosis im zerebralen Kortex zu. Die spezifische Aktivität von Komplex I + III, Komplex II + III und Komplex IV zeigte in keiner der vier untersuchten Hirnregionen zerebraler Kortex, Thalamus, Striatum oder Hippokampus Änderungen nach Betamethasongabe.

Diese insgesamt uneinheitlichen und gering ausgeprägten Änderungen sind möglicherweise auf Streuungen zurückzuführen, die durch den bereits in Kontrollpopulationen nachweisbaren variierenden Mitochondriengehalt des Hirngewebes (Barrientos et al. 1996, Casademont et al. 2004, Chretien et al. 1998, Chretien et al. 1994, Lefai et al. 1995) verursacht wurden. Außerdem gibt der nicht-kollagene Proteingehalt des Gewebehomogenates den Proteingehalt aller Zellbestandteile wieder, so dass sich die spezifischen Aktivitäten nicht ausschließlich auf den Gehalt an mitochondrialem Protein beziehen. Durch die Normierung auf die Aktivität der Citratsynthase, die als Teil des Zitratzyklus in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist, konnten wir die Aktivitäten unabhängig vom Mitochondriengehalt des Homogenats als CS-normierte Aktivitäten darstellen (Benard et al. 2006, Rustin et al. 1991, Schwerzmann et al. 1989) und den Nachteil der Aktivitätsmessungen im unfraktionierten Homogenat gegenüber denen an isolierten Mitochondrien ausgleichen, die naturgemäß nur den Gehalt an mitochondrialem Protein berücksichtigen (Barrientos 2002). Vor diesem Hintergrund und da sich auch durch die Normierung auf die Citratsynthase und Succinat-Dehydrogenase keine Hinweise für Glukokortikoideffekte auf die Atmungskettenkomplexe im Thalamus ergaben (siehe unten), ist die Abnahme der spezifischen Aktivität von Komplex I + III im Thalamus möglicherweise als falsch positives Ergebnis zu interpretieren. Dies zeigt die Notwendigkeit der Normierungen.

#### CS-normierte Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe

Durch die Normierung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe auf die Aktivität der Citratsynthase stellten sich deutliche und reproduzierbare Betamethasoneffekte dar. So nahmen die CS-normierte Aktivität von Komplex I + III und von Komplex IV spezifisch im zerebralen Kortex unabhängig von der verabreichten Betamethasondosis ab. Die CS-

normierten Aktivitäten der SDH (Teil von Komplex II) und von Komplex II + III dagegen zeigten in keiner der vier untersuchten Regionen Änderungen nach Betamethasongabe.

Die Minderungen der CS-normierten Aktivitäten der NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex I + III) und der COX (Komplex IV) ohne Beeinträchtigung der CS-normierten Aktivitäten von SDH (Teil von Komplex II) und Succinat-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex II + III) im zerebralen Kortex legen eine selektiv hemmende Wirkung von Betamethason auf Höhe der Enzymkomplexe I und IV der Atmungskette in dieser Hirnregion nahe. Beide Komplexe nehmen aufgrund ihrer Positionen am Eingang bzw. Ende der Atmungskette eine Schlüsselstellung in der Regulation des Elektronenflusses durch das System der vier Multienzymkomplexe ein (Hatefi 1985). Für Komplex IV, der mit der Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff den terminalen Schritt des Elektronentransportes katalysiert, gilt dies in besonderer Weise (Capaldi 1990b). Es scheint daher nur natürlich, dass eine Regulation des Systems der oxidativen Phosphorylierung, ob durch intrinsische oder extrinsische Signale, v. a. an diesen Schlüsselenzymen stattfindet. Ein besonderer Einfluss von Komplex IV auf die Regulation und Funktion der gesamten Atmungskette wird in diesem Zusammenhang vermutet (Benard et al. 2006, Gnaiger et al. 1998, Kunz et al. 1999, Piccoli et al. 2006, Villani et al. 1998).

Die Hemmung sowohl von Komplex I als auch von Komplex IV durch Glukokortikoide ist schon *in vitro* an isolierten Mitochondrien verschiedener adulter Gewebe beschrieben worden. Neben einem oxygraphisch ermittelten verminderten Sauerstoffverbrauch und einem herabgesetzten Atmungskontrollkoeffizienten nach Zugabe von einem der vier Glukokortikoide Hydrocortison, Triamcinolon, Dexamethason und Prednisolon in geringen Dosen ( $< 1 \mu\text{M}$ ), zeigte einzig das fluoridierte synthetische Glukokortikoid Dexamethason, bei den spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe, aktivitätsmindernde Effekte spezifisch auf Komplex I der Atmungskette in isolierten Mitochondrien des adulten Rattenhirns (Morin et al. 2000). Die Aktivitäten der Komplexe II, III und IV waren dabei durch den Glukokortikoidzusatz zu den isolierten Mitochondrien nicht vermindert. Zuvor hatten Martens et al. (1991), nach der hochdosierten Zugabe von Methylprednisolon ( $> 100 \mu\text{M}$ ) zu isolierten Mitochondrien des Skelett- und des Herzmuskels sowie der Leber adulter Ratten, von der Hemmung der mitochondrialen Atmung auf Höhe von Komplex I berichtet. In isolierten Mitochondrien der adulten Rattenniere führte demgegenüber die Zugabe sowohl von Dexamethason als auch Hydrocortison, Triamcinolon und Prednisolon zu einer Hemmung von Komplex IV, aber nicht von Komplex I, die Simon

et al. (1998) für die konsekutive Minderung der gemessenen mitochondrialen Atmungsraten verantwortlich machten. Dexamethason und Betamethason sind zwei, in ihrer Struktur sehr ähnliche Stereoisomere, unterscheiden sich in ihrer Funktion nur unwesentlich, besitzen dieselbe glukokortikoide Potenz und werden mit vergleichbarem Erfolg antenatal zur Induktion der fetalen Lungenreifung eingesetzt (Derks et al. 1997, Elimian et al. 2007, Murphy 2007, Rayburn et al. 1997). Ihre Effekte sind deshalb gut vergleichbar.

Untersuchungen *in vivo* zeigten ebenfalls selektiv hemmende Effekte von Glukokortikoiden auf einzelne Atmungskettenkomplexe. Schon Kimberg et al. (1968) beschrieben drei Positionen in der Atmungskette, die sie für die Minderung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im Lebergewebe kortisonbehandelter Ratten verantwortlich machten. Zu diesen zählten auch der erste und der terminale Schritt des Elektronentransportes. Im adulten Rattenhirn führte die Gabe von Kortikosteron im Synergismus mit Aziden *in vivo* hemmend auf die Aktivität von Komplex IV (Bennett et al. 1996).

Im Skelettmuskel adrenaletomierter adulter Ratten führte die Gabe von Kortikosteron in Dosen unter- und oberhalb der physiologischen Normwerte nicht nur zu einer verminderten Anzahl funktionstüchtiger Mitochondrien, erkennbar an geminderten Aktivitäten von COX (Komplex IV) und SDH, sondern auch zu einem Abfall der SDH-normierten COX-Aktivität (Duclos et al. 2004). Die Autoren schlossen daraus, dass mitochondriale Funktionen durch verschiedene Wirkmechanismen von Glukokortikoiden reguliert werden können, zu denen auch der direkte Einfluss auf die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe, in diesem Fall Komplex IV, zählt.

Demgegenüber stehen Studien am Skelettmuskel von nicht-adrenaletomierten adulten Ratten, die stimulierende Effekte von Glukokortikoiden auf Teile der Atmungskette und die Mitochondrienfunktion beschreiben (Weber et al. 2002) oder in denen keine Einflüsse auf die Enzymkomplexe gefunden werden konnten (Dumas et al. 2003, Marone et al. 1994). Die Vergleichbarkeit dieser Effekte mit unseren Ergebnissen ist stark eingeschränkt, da z. B. Weber et al. (2002) Dexamethason in Dosen einsetzten, die über den in der Glukokortikoid-Therapie verwendeten Dosierungen lagen, während etwa Duclos et al. (2004) durch die Gabe des natürlichen Glukokortikoids Kortikosteron maximale Plasmakonzentrationen verabreichten, die die Verhältnisse unter chronischem Stress simulieren sollten. Darüberhinaus handelt es in diesen Studien um chronische Gaben. Marone et al. (1994) untersuchten die Effekte der chronischen Gabe von Kortisol in der Dosis von  $100 \mu\text{g}/(\text{kg KG}) \times \text{d}$  für die Dauer von 11 Tagen auf die Stimulation der Aktivität von

Komplex IV durch Ausdauertraining im Skelettmuskel von Ratten. Dumas et al. (2003) verabreichten  $1,5 \text{ mg}/(\text{kg KG}) \times \text{d}$  für die Dauer von 5 Tagen und fanden in isolierten Mitochondrien des Lebergewebes adulter Ratten keine Änderungen der Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe. Alle Studien, die von unseren Ergebnissen abweichende oder keine Effekte von Glukokortikoiden auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe beschrieben, fanden an adulten Geweben wie Skelettmuskel- oder Lebergewebe unter der Gabe von Glukokortikoiden und in Dosierungen statt, wie sie bei der antenatalen Therapie zur Induktion der fetalen Lungenreifung nicht zur Anwendung kommen. Die Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, die am fetalen Hirngewebe unter der Gabe klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung verwendeten und reduzierten Dosierungen stattfand, ist daher stark eingeschränkt.

#### SDH-normierte Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe

Ähnlich wie bei den CS-normierten Aktivitäten zeigte sich eine dosisunabhängige Abnahme der SDH-normierten Aktivitäten von Komplex I + III und Komplex IV nach Betamethason spezifisch im zerebralen Kortex. Die SDH-normierte Aktivität von Komplex II + III zeigte wie die CS-normierte Aktivität keine Beeinflussung durch Betamethason. Die SDH ist ein Teil von Komplex II, der als einziger der vier Atmungskettenkomplexe ausschließlich nukleär kodiert wird. Sie kann daher nicht nur als mitochondrialer Marker verwendet werden (Garcia et al. 1985, Lebrecht et al. 2005, Letellier et al. 2000). Die Angabe der auf die Aktivität der SDH normierten Enzymkomplexaktivitäten der Atmungskette als SDH-normierte Aktivität erlaubte ferner einen Blick auf die Regulation der Atmungskette unabhängig von der Regulation von Polypeptiden der Atmungskette (wie Komplex II), die potentiell über rein nukleär-genomisch vermittelte Wirkmechanismen durch Glukokortikoide beeinflussbar sind (Lebrecht et al. 2005).

#### **5.2.3.4 Potentielle Mechanismen der Glukokortikoideffekte auf die Aktivität der Enzymkomplexen der Atmungskette**

Es geht über die Zielstellung der vorliegenden Arbeit hinaus die molekularen Wirkungsmechanismen zu differenzieren, die den beobachteten Glukokortikoideffekten zu Grunde lagen. Dennoch lassen sich aus den Ergebnissen, und besonders durch die Normierung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe auf die Aktivität der Succinat-



Dehydrogenase, Schlüsse auf potentielle Mechanismen der Enzymregulation der Atmungskettenkomplexe durch Betamethason ziehen.

#### ***5.2.3.4.1 Genomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen auf die Enzymkomplexe der Atmungskette***

##### nukleär-genomische Mechanismen

Die Entnahme der Hirngewebeproben erfolgte im Abstand von 24 h nach der zweiten Betamethasongabe. Bestimmungen der Enzymaktivitäten zu diesem Zeitpunkt berücksichtigen die biologische Halbwertszeit der Betamethasonwirkung, die bei 36 h liegt, und die Latenzzeit, die für das Auftreten der klassischen genomisch vermittelten Wirkungen charakteristisch ist (Schömig und Taubert 2007). Zytoplasmatische Glukokortikoidrezeptoren vom Typ II, die als Transkriptionsfaktoren auf die Expression auch mitochondrialer Polypeptide wirken können und eine hohe Affinität für Betamethason besitzen, sind in den meisten Hirnregionen und auch im zerebralen Kortex vorhanden, in dem die Betamethasonwirkungen beobachtet wurden, sowie im Thalamus und Hippokampus, die eine solche Wirkung allerdings nicht erkennen ließen (Ahima und Harlan 1990, Cintra et al. 1994).

##### mitochondrial-genomische Mechanismen

Seit der Identifikation von mitochondrialen Glukokortikoidrezeptoren und Glukokortikoid-responsiven Elementen auf der mt-DNA in Mitochondrien der Leber, der Astroglia und der Netzhaut in jüngster Zeit, wird die Wirkung von Glukokortikoiden auch auf die Expression mitochondrial lokalisierter Gene diskutiert (Demonacos et al. 1995, Demonacos et al. 1996, Koufali et al. 2003, Tsiriyotis et al. 1997). Auch im Hirngewebe von adulten Ratten fanden sich mitochondrial lokalisierte Glukokortikoidrezeptoren (Moutsatsou et al. 2001). Die Komplexe I, III und IV der Atmungskette enthalten auch Untereinheiten, deren Gene auf der mt-DNA lokalisiert sind (Saraste 1999). Ein durch mitochondriale Glukokortikoidrezeptoren vermittelter Regulationsmechanismus der Enzymaktivitäten der Komplexe I, III und IV über Änderungen der Biosynthese der mitochondrial kodierten Untereinheiten kommt daher auch für einen Teil der Wirkungen von Glukokortikoiden auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel in Betracht. Als einziger der vier Komplexe der Atmungskette ist Komplex II inklusive der beiden Untereinheiten, die die Succinat-Dehydrogenase bilden, ausschließlich nukleär kodiert (Hägerhäll 1997). Sie eignet sich daher als Indikator nukleär-genomisch vermittelter Funktionsänderungen der Atmungskette (Li et al. 2001). Im Falle einer Aktivitätsänderung der Komplexe I, III und IV in Folge der Regulation mitochondrialer

Gene, bildet sich dies auch in einer Änderung des Verhältnisses zu der Aktivität des Komplex II ab, d. h. auch in der SDH-normierten Aktivität. So nutzten Lebrecht et al. (2005) das Aktivitätsverhältnis von COX zu Succinat-Dehydrogenase, was der in der vorliegenden Arbeit verwendeten SDH-normierten Aktivität von Komplex IV entspricht, als Indikator für das Auftreten von Phänotypen der Untereinheiten der COX, die durch Schädigungen der mt-DNA durch reaktive Sauerstoffspezies zu einer Beeinträchtigung der Funktion mitochondrial kodierter Polypeptide führen.

Die von uns beobachteten Minderungen der SDH-normierten Aktivitäten der Komplexe I + III und IV nach Betamethasongabe sind also wahrscheinlich durch einen negativen Effekt von Betamethason auf die Expression der am Aufbau der Atmungskettenkomplexe beteiligten, mitochondrial kodierten Polypeptide verursacht. Dies ist natürlich nicht hinreichend, um einen mitochondrial-genomisch vermittelten Wirkungsmechanismus zu beweisen. Um diesen Sachverhalt zu klären, wären Folgeuntersuchungen nötig, die Änderungen der Expressionsrate der entsprechenden mitochondrial lokalisierten DNA-Abschnitte durch eine antenatale Betamethasongabe im zerebralen Kortex nachweisen.

Es gibt aber bereits Belege, die auf die Bedeutung solcher mitochondrial-genomisch vermittelten Mechanismen für Glukokortikoidwirkungen auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel hinweisen. Die Atmungskettenkomplexe I, III und IV sind Holoenzyme, deren katalytische Funktionen vorrangig durch die mitochondrial kodierten Untereinheiten übernommen werden, deren Bestandteil auch die beiden Cytochrome aa<sub>3</sub> (Komplex IV) und b (Komplex III) sind (Poyton und McEwen 1996). In isolierten Mitochondrien des Hirngewebes juveniler und adulter Ratten wurde der Gehalt an Cytochrom aa<sub>3</sub> und Cytochrom b durch eine Dexamethasonbehandlung vermindert (Pandya et al. 2007). Die Autoren vermuteten, dass Dexamethason einen negativen Effekt auf die Expression der betroffenen mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex III und IV haben könnte. Leider waren Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe nicht Bestandteil dieser Studie. Die Aktivität der ATP-Synthase jedoch, die ebenfalls zwei mitochondrial kodierte Untereinheiten mit katalytischer Funktion enthält (Saraste 1999), war nach der Dexamethasonbehandlung im Hirngewebe juveniler und adulten Ratten gleichermaßen vermindert, was die These stützt, nach der Glukokortikoide negative Effekte auf die Expression mitochondrial kodierter Proteinanteile haben können und so zu einer Aktivitätsminderung der betroffenen Enzyme der oxidativen Phosphorylierung führen können (Pandya et al. 2007). Paradoxerweise erbrachten die oxygraphischen Messungen zur Mitochondrienfunktion in derselben Studie stimulierende

Effekte auf die Atmungsraten juveniler, wachsender Tiere gegenüber hemmenden Effekten auf die Funktion der Mitochondrien im adulten Rattenhirn durch Dexamethason. Der Einfluss von Dexamethason auf die Regulation der mitochondrialen Atmung war laut Pandya et al. (2007) also abhängig von Alter und Entwicklungsstand der Tiere, der Einfluss auf den Cytochromgehalt der Mitochondrien dagegen zeigte eine solche Altersabhängigkeit nicht. In einer vorausgegangenen Studie dagegen zeigten sich in allen untersuchten Altersgruppen Abnahmen der oxygraphisch ermittelten Atmungsraten der isolierten Mitochondrien nach der akuten und chronischen Behandlung mit Kortikosteron, wobei der Grad der mitochondrialen Funktionseinbuße auch hier von Alter und Entwicklung der untersuchten juvenilen und adulten Tiere abhing (Katyare et al. 2003).

Die Altersabhängigkeit der Glukokortikoidwirkung auf den Zustand der mitochondrialen Gesamtfunktion im Hirngewebe von Ratten trotz altersunabhängiger verminderter Expression mitochondrial kodierter Polypeptide der Atmungskettenkomplexe (Katyare et al. 2003, Pandya et al. 2007) lässt auf ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Mechanismen bei der Regulation des Systems der oxidativen Phosphorylierung, wie z. B. die Transaktivierung oder die Transrepression von sowohl nukleär als auch mitochondrial lokalisierten Genen der am Aufbau der Atmungskette beteiligten Polypeptide, schließen. Diese Studien zeigen außerdem den Einfluss von Alter und Entwicklung auf die Ausprägung dieser regulativen Mechanismen der Glukokortikoidwirkung auf die mitochondriale Aktivität.

Die regionale Verteilung nukleärer und mitochondrialer Glukokortikoidrezeptoren im Gehirn kann zudem zu regionalen Unterschieden der Glukokortikoidwirkung auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe beitragen (s. Kap. 5.2.3.4.3).

#### ***5.2.3.4.2 Nichtgenomisch vermittelte Glukokortikoidwirkungen auf die Enzymkomplexe der Atmungskette***

Vor allem die binnen Minuten auftretenden Effekte von Glukokortikoiden auf die Hirnfunktion und das Verhalten auch bei Säugetieren können durch das Modell der klassischen genomischen Mechanismen nicht erklärt werden. Diese werden wahrscheinlich durch nichtgenomische Wirkungsmechanismen von Glukokortikoiden vermittelt (Duval et al. 1983). Dabei wird weiter zwischen spezifischen, membranrezeptorvermittelten und unspezifischen, rezeptorunabhängigen Mechanismen unterschieden (Eberhardt und Kilz 2003, McEwen 1994b).

### Spezifische nichtgenomische Glukokortikoidwirkungen

Die Vermittlung rascher Glukokortikoidwirkungen, die die für das Einsetzen der genomisch vermittelten Wirkungen charakteristische Latenzzeit unterschreiten, erfolgt vorrangig sehr wahrscheinlich über spezifische, membranständige Rezeptoren, die sich in Bau und Funktion von den klassischen Glukokortikoidrezeptoren unterscheiden (Evans et al. 2000, Moore und Evans 1999, Moore et al. 1995, Orchinik et al. 1994). Die Signalkaskade der spezifischen nichtgenomischen Steroideffekte aus Rezeptor und Second Messenger ist denen von Katecholaminen und Peptidhormonen vergleichbar und scheint verschiedene Transduktionssysteme wie Phospholipase C, Inositoltriphosphat, Tyrosin-Kinase,  $\text{Ca}^{2+}$ , G-Proteine und andere einzubeziehen (Orchinik et al. 1992, Wehling 1997). Allerdings besitzen die bisher identifizierten Rezeptoren dieses Typs ein spezifisches Affinitätsspektrum für die verschiedenen Glukokortikoide, das sich von dem der klassischen intrazellulären Glukokortikoidrezeptoren unterscheidet (Moore und Evans 1999). So riefen Kortikosteron und Kortisol zwar rasche Wirkungen auf die elektrophysiologische Hirnfunktion und das Verhalten von Amphibien hervor, Dexamethason dagegen band nicht an den membranständigen Glukokortikoidrezeptor und zeigte daher keine schnellen Wirkungen (Orchinik et al. 1991). Für die nichtgenomische Regulation der oxidativen Phosphorylierung durch Glukokortikoide über spezifische membranständige Glukokortikoidrezeptoren sind bisher keine Beispiele bekannt. Auch für nichtgenomische Effekte aktivierter intrazytosolischer Glukokortikoidrezeptoren (Falkenstein et al. 2000) auf die Mitochondrienfunktion gibt es bislang keinen Anhalt.

### Unspezifische nichtgenomische Glukokortikoidwirkungen

Unspezifische nichtgenomische Effekte wurden in Zusammenhang mit der Regulation der oxidativen Phosphorylierung nach hoch dosierter Gabe von Methylprednisolon beschrieben (Buttgereit 2000). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um direkte Wechselwirkungen der Glukokortikoide mit biologischen Membranen. Die veränderte Fluidität würde auch den beobachteten Anstieg der Protonenpermeabilität der inneren Mitochondrienmembran und die konsekutive partielle Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in Lymphozyten nach hochdosierter Glukokortikoidgabe erklären, die schließlich zu verminderter ATP-Produktion führte (Buttgereit 2000). Allerdings ist der Grad der Kopplung von Atmungskette und ATP-Synthase durch die Aktivitätsmessungen der Enzymkomplexe, wie wir sie vorgenommen haben, nicht zu beurteilen. Auch die zusätzliche Bestimmung der ATP-Konzentration kann nur indirekt Auskunft über die Effizienz der mitochondrialen ATP-Produktion geben.

Insgesamt können wir nicht zwischen genomischen und nichtgenomischen Effekten differenzieren, da die Bestimmungen ca. 48 h nach der ersten Betamethasongabe stattfanden. Die Modulation der genomisch vermittelten Wirkungen durch spezifische nichtgenomische Glukokortikodsignale ist aber nicht auszuschließen (Chen und Qiu 2001).

#### **5.2.3.4.3 Regionalspezifische Unterschiede der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette**

Die von uns beobachteten Hemmungen der Komplexe I + III und IV nach antenataler Betamethasongabe waren spezifisch für den zerebralen Kortex. Hierfür gibt es drei Erklärungsmöglichkeiten: zum Ersten Unterschiede in der Glukokortikoidsensitivität von neuronalen Subpopulationen in den Hirnregionen, zum Zweiten die Abhängigkeit der Glukokortikoidsensitivität vom Entwicklungsstand der Hirnregion und zum Dritten die regionale Verteilung nukleärer und mitochondrialer Glukokortikoidrezeptoren.

1. Eine mögliche Ursache für die regionalspezifische Ausprägung der von uns beobachteten Glukokortikoidwirkungen sind Unterschiede in der Glukokortikoidempfindlichkeit der neuronalen Subpopulationen in den verschiedenen Hirnregionen. Um populationsspezifische Glukokortikoidwirkungen auf die Atmungskette nachzuweisen, wären ähnliche Untersuchungen in Zellkulturen der verschiedenen Zelllinien nötig. Diese vernachlässigen allerdings wieder die Bedingungen *in vivo*.
2. Die zweite mögliche Ursache für die von uns selektiv im zerebralen Kortex beobachteten Glukokortikoideffekte auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I + III und IV ist die vom Entwicklungsstand der betreffenden Hirnregion abhängige Glukokortikoidsensitivität (Matthews 2001). Dass die Wirkungen von Glukokortikoiden auf den oxidativen Energiestoffwechsel im Gehirn von Alter und Entwicklung abhängen, zeigte sich schon in isolierten Mitochondrien des Rattenhirns (Katyare et al. 2003, Pandya et al. 2007). Diese Studien wurden allerdings postnatal am sich entwickelnden Gehirn sowie am adulten Gehirn der Ratte durchgeführt, ohne eine Unterscheidung zwischen den Hirnregionen vorzunehmen. Wie bereits im Kap. 5.2.3 beschrieben, entwickelt sich der zerebrale Kortex aber später als die anderen Hirnregionen (Erecinska et al. 2004).
3. Eine dritte mögliche Erklärung für die regionalen Unterschiede in der Ausprägung der von uns beobachteten Effekte bietet die regionalspezifische Verteilung von zytosolischen Glukokortikoidrezeptoren (De Kloet et al. 1993, Kawata et al. 1998), geht man von einer

rezeptorvermittelten Glukokortikoidwirkung aus, eine weitere Erklärung. Im Gegensatz zu den Mineralokortikoidrezeptoren jedoch, die nur eine geringe Affinität für synthetische Glukokortikoide wie das Betamethason aufweisen, sind die klassischen zytosolischen Glukokortikoidrezeptoren, die eine hohe Affinität für synthetische Glukokortikoide besitzen (Yang et al. 1990), in den meisten Hirnregionen vorhanden, wie beim adulten Rattenhirn nachgewiesen wurde (Ahima und Harlan 1990, Cintra et al. 1994). Glukokortikoidrezeptoren sind ab dem 60. Tag der Gestationsdauer beim fetalen Schaf nachweisbar (Brodhun et al. 2003). Besonders der Hippokampus, in dem kein Effekt von Betamethason auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe nachgewiesen werden konnte, und auch der zerebrale Kortex, in dem sich dagegen Betamethasoneffekte auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe zeigten, sind reich mit ihnen ausgestattet (Alexis et al. 1983, Fuxe et al. 1987, Kawata et al. 1998, McGimsey et al. 1991, Szuran et al. 1997).

Auch die mitochondrial lokalisierten Glukokortikoidrezeptoren könnten unterschiedlich auf die Hirnregionen verteilt sein und so zu den beschriebenen regionalen Unterschieden der Betamethasoneffekte auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in den Mitochondrien geführt haben, vorausgesetzt, die Effekte waren zumindest teilweise durch mitochondrial-genomische Mechanismen vermittelt. Dies betrifft umso mehr die Spezifika der Glukokortikoideffekte und der Regulation der Funktionen der Atmungskette während der Entwicklung. Allerdings zeigten sich zumindest in der adulten Ratte die von Moutsatsou et al. (2001) beschriebenen Rezeptoren dieser Art sowohl in kortikalem als auch hippokampalem Gewebe. Zur Reifung und Verteilung mitochondrial lokalisierter Glukokortikoidrezeptoren im fetalen Hirngewebe liegen nach unseren Recherchen bisher keine Daten vor. Auch wenn aus der morphologischen Verteilung der nuklären und mitochondrialen Glukokortikoidrezeptoren keine Aussagen über die Reife bzw. Aktivität der Rezeptoren möglich sind, spricht die ubiquitäre Verteilung der Glukokortikoidrezeptoren im Gehirn gegen eine verteilungsbedingte regional unterschiedliche Sensitivität des Hirngewebes für Glukokortikoide.

#### ***5.2.3.4.4 Dosisunabhängigkeit der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette***

In dem Dosisbereich von Betamethason, der in unserer Studie verwendet wurde, zeigte sich eine dosisunabhängige Wirkung auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe im

zerebralen Kortex. Damit kann man davon ausgehen, dass die von uns verabreichten Betamethasondosen bezüglich ihrer Effekte auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe supramaximal waren.

Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass sich die verschiedenen Mechanismen der Glukokortikoidwirkungen überlagern, ergänzen, wechselseitig regulieren und dabei nicht zwangsläufig den für klassische rezeptorvermittelte Medikamentwirkungen typischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen folgen. Als große Besonderheit ist in diesem Zusammenhang immer wieder die Existenz von nukleärem und mitochondrialem Genom hervorzuheben, die sowohl unabhängig voneinander als auch im Zusammenspiel, möglicherweise auch durch jeweils spezifische aktivierte Glukokortikoidrezeptoren reguliert werden können (Poyton und McEwen 1996). Fast alle Funktionen der Mitochondrien und auch die der Enzymkomplexe der Atmungskette sind von der Expression sowohl von nukleären als auch mitochondrialen Genen abhängig (s. Kap. 1.3.1). Weitere Faktoren kommen hinzu (Weber et al. 2002) und gestalten die Regulation noch komplexer. Es ist daher keineswegs sicher, dass sich die Medikamentenwirkung auch in einer typischen Dosisabhängigkeit äußert.

#### **5.2.3.5 Bedeutung der Glukokortikoideffekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette**

Die von uns beobachtete Minderung der CS-normierten Aktivität von Komplex I+ III betrug, je nach verabreichter Dosis, im zerebralen Kortex zwischen 30 und 34 % nach Betamethason. Die Minderung der SDH-normierten Aktivität nach Betamethason in derselben Region lag zwischen 22 und 30 %. Die CS-normierte und die SDH-normierte Aktivität von Komplex IV verhielten sich mit Minderungen zwischen 36 und 37% bzw. 26 und 28 % nach Betamethason im zerebralen Kortex ganz ähnlich.

Untersuchungen an isolierten Mitochondrien des adulten Rattenhirns zeigten systematisch die Abhängigkeit der mitochondrialen Atmungs- und ATP-Syntheserate von den Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, III und IV (Davey und Clark 1996, Davey et al. 1998). Dabei wurde durch Titration der Mitochondriensuspension mit spezifischen Inhibitoren für jeden der drei Atmungskettenkomplexe ein spezifischer Schwellenwert der Hemmung bestimmt, ab dem die oxygraphisch bestimmte Atmungsrate sowie die ATP-Produktion in den Mitochondrien deutlich messbar abnahmen. Rossignol et al. (Rossignol et al. 1999) fanden mit Hilfe dieser Methode in isolierten Mitochondrien des Hirngewebes adulter Ratten Schwellenwerte für die Hemmung der Atmungskettenkomplexe: ca. 50 % für Komplex I, ca.

91 % für Komplex III und ca. 88 % für Komplex IV. Andere Autoren unterschieden zwischen synaptischen und nichtsynaptischen Mitochondrien. Da wir im unfraktionierten Gewebehomogenat gemessen haben, welches sowohl synaptische als auch nichtsynaptische Mitochondrien enthielt, sind uns Unterscheidungen zwischen synaptischen und nichtsynaptischen Mitochondrien nicht möglich gewesen. Demnach würde die von uns beobachtete Hemmung des Komplexes I unter dem Schwellenwert von 50 % liegen (Rossignol et al. 1999) und nur einen geringen oder gar keinen Effekt auf die ATP-Synthese haben. Erst recht keinen Effekt auf die ATP-Synthese sollte die Hemmung des Komplexes IV in unseren Untersuchungen haben, da hier der Schwellenwert für unfraktionierte Mitochondrien mit 88 % angegeben wird (Rossignol et al. 1999) und die Aktivitätshemmung von Komplex IV durch Betamethason von uns mit etwas mehr als 30 % gemessen wurde. Die Situation stellt sich jedoch anders dar, wenn die synaptischen und nichtsynaptischen Mitochondrienfraktionen betrachtet werden.

In synaptischen Mitochondrien lag der Grad der Hemmung von Komplex I ab dem ATP-Gehalt und Sauerstoffverbrauch abnehmen bei 25 % (Davey et al. 1998). Für die Komplexe III und IV lagen die entsprechenden Schwellenwerte mit Hemmungen von 80 bzw. 70 % deutlich höher. Die von uns gemessene Aktivitätsminderung von Komplex I + III um ca. 30 % nach Betamethason könnte damit über Beeinträchtigung der synaptischen Mitochondrien zu einer verminderten ATP-Synthese und damit zu einer energetischen Depression geführt haben. Gerade für die Hirnfunktion könnte die selektiv in den Synapsen potentiell eingeschränkte ATP-Produktion von großer Bedeutung sein. Die Hemmung des Komplex IV durch Betamethason hat dagegen keinen großen Einfluss auf die synaptische mitochondriale Atmung und die ATP-Synthese gehabt, da sie mit ca. 30 % weit unter dem Schwellenwert von 70 % Hemmung blieb (Davey et al. 1998).

In nichtsynaptischen Mitochondrien des adulten Rattenhirns hatten Davey und Clark (Davey und Clark 1996) mit ca. 72 % Hemmung der Aktivität von Komplex I einen wesentlich höheren Schwellenwert als für die synaptischen Mitochondrien bestimmt, bevor es zu einer deutlich messbaren Änderung der mitochondrialen Atmung und der ATP-Synthese kam.

Der Vergleich mit den Schwellenwerten für die Hemmung der ATP-Synthese unterliegt jedoch vielen Einschränkungen.

Alle genannten Untersuchungen machen zu dem möglichen Einfluss der kombinierten Hemmung mehrerer Atmungskettenkomplexe keine Angaben. Da wir sowohl für Komplex I + III als auch für Komplex IV Aktivitätsminderungen durch Betamethason



gefunden haben scheint der Einfluss von Glukokortikoiden auf die ATP-Produktion und den Energiegehalt der Zellen im fetalen Hirngewebe des zerebralen Kortex durch die kombinierte Hemmung wahrscheinlicher.

Zudem gelten im fetalen Hirngewebe durch die entwicklungsbedingten Unterschiede des Gehaltes an Enzymkomplexen der Atmungskette (Erecinska et al. 2004) möglicherweise andere Schwellenwerte. Die überschüssige Aktivität von Atmungskettenenzymen, die zur Entstehung solcher Schwellenwerte für die Beeinträchtigung der Funktion des Systems der oxidativen Phosphorylierung führt, hängt nämlich sowohl von der intrinsischen Aktivität als auch vom Gehalt an Enzymprotein ab (Rossignol et al. 1999). Da die Aktivitäten der Enzymkomplexe der Atmungskette mit der Entwicklung zunehmen (Almeida et al. 1995, Bates et al. 1994, Mjaatvedt und Wong-Riley 1988, Wilson 1972), ist zu Beginn der Hirnentwicklung, also vermutlich auch im fetalen Stadium, wenn der Gehalt an Enzymprotein noch vergleichsweise niedrig ist, die Überschusskapazität der Atmungskettenkomplexe wahrscheinlich geringer ausgeprägt als in den Stadien fortgeschrittener Hirnentwicklung. Das würde bedeuten, dass im fetalen Hirngewebe auch gering ausgeprägte Enzymhemmungen der Atmungskettenkomplexe zu Beeinträchtigungen der ATP-Synthese führen könnten, die im adulten Hirngewebe ohne messbare Folgen blieben. In der Literatur finden sich dazu nach unseren Recherchen bisher keine Angaben.

Darüber hinaus handelt es sich bei den Schwellenwerten um Ergebnisse aus Experimenten an isolierten Mitochondrien *in vitro*, unter möglichst optimalen Bedingungen der Versorgung mit Sauerstoff und Substraten, die sich auf die Bedingungen *in vivo* nicht einfach extrapolieren lassen. So zeigte sich bei der Entwicklung eines Rattenmodells für Morbus Alzheimer bereits ab einer Hemmung der Aktivität von Komplex IV um 35 % durch den spezifischen Inhibitor Natrium-Azid ein Lerndefizit der Tiere (Bennett et al. 1992). Die von uns gemessene Hemmung von Komplex IV lag in der Normierung auf die Citratsynthase mit 36–37 % in etwa in diesem Bereich, in dem es *in vivo*, in den Untersuchungen von Bennett et al. (1992), zu funktionellen Einbußen der mitochondrialen Aktivität gekommen sein muss, wie die Symptomatik zeigte.

Zu einer energetischen Depression durch die potentiell verminderte ATP-Synthese im fetalen Hirngewebe kommen noch weitere mögliche wichtige Folgen der von uns beobachteten Hemmungen der Atmungskettenkomplexe I und IV im zerebralen Kortex von antenatal mit Betamethason behandelten Schafsfeten. So ist v. a. Komplex I in hohem Maße an der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (Bandy und Davison 1990). Ist der

Elektronentransport durch die Atmungskette gestört, kommt es durch die direkte Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff zur Bildung von Superoxidradikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ). Im Falle von Komplex I kann schon eine geringe Minderung der Aktivität um 16 % zur vermehrten Radikalbildung führen (Sipos et al. 2003). Die von uns gemessene Minderung der Aktivität von Komplex I + III lag deutlich über 16 %. Treten zusätzlich Störungen abwärts in der Elektronentransportkette auf, wie z. B. durch eine Hemmung von Komplex IV, begünstigt dies die Radikalbildung auf Höhe von Komplex I und Komplex III. Unter oxidativem Stress wiederum kommt es zu Minderungen der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe (Tretter et al. 2004). Unter chronisch oxidativem Stress und beeinträchtigter Mitochondrienfunktion entsteht so ein *circulus vitiosus*, in dessen Verlauf sich die verminderte Funktion von Atmungskettenkomplexen und die Radikalbildung gegenseitig verstärken (Adam-Vizi 2005, Adam-Vizi und Chinopoulos 2006). Die ROS können mit allen Arten von Biomolekülen reagieren und sie dadurch funktionell schwer beeinträchtigen. Damit nehmen sie Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen und sind an etlichen pathophysiologischen Abläufen beteiligt. Die vermehrte Generierung von ROS spielt z. B., ebenso wie die energetische Depression der Zelle infolge einer Minderung der mitochondrialen Energieproduktion, auch bei der Induktion der Apoptose durch die Öffnung der mitochondrial lokalisierten Permeability Transition Pore eine wichtige Rolle (Green und Reed 1998, Liu et al. 1996, Susin et al. 1999, Zoratti und Szabo 1995).

Zellschäden durch oxidativen Stress sowie der Zelluntergang infolge des programmierten Zelltodes sind aber v. a. zur Erklärung von Langzeitwirkungen der antenatalen Glukokortikoidgabe auf das fetale Gehirn geeignet. Sie waren nicht Gegenstand der vorliegenden Studie. Dennoch sind Gewebe, in denen die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe vermindert sind, sensibler für metabolische Störungen, z. B. durch Unterbrechungen der Nährstoff- oder Sauerstoffzufuhr. So sind z. B. auch die Aktivitätsminderungen von Komplex IV im Hirngewebe adulter Ratten für die Exazerbation hypoxisch-ischämischer Hirnschäden durch Glukokortikoide von Bedeutung (Chandel et al. 1995, Smith-Swintosky et al. 1996, Tombaugh et al. 1992). Hypoxisch-ischämische Hirnschäden zählen zu den häufigsten und wichtigsten Geburtskomplikationen und führen zu Infarkt und Langzeitschäden wie Zerebralparesen und neurologisch-kognitiven Defiziten.

Für die akuten Effekte der antenatalen Glukokortikoidtherapie zur Induktion der fetalen Lungenreife auf die fetale elektrokortikale Hirnfunktion (Schapira 1998, Schleussner et al. 2004, Schwab et al. 2001a) und den Gehalt wesentlicher zerebraler Strukturproteine, wie

MAP1B, MAP2 (Antonow-Schlorke et al. 2003, Schwab et al. 2001b) und Synaptophysin (Antonow-Schlorke et al. 2001) im zerebralen Kortex, Putamen und Hippokampus des fetalen Gehirns, ist eher die potentielle unmittelbare Minderung der ATP-Synthese durch die von uns beobachtete Hemmung der Atmungskettenkomplexe I und IV wichtig (Newman et al. 2000). So ging der durch eine Hypoxie herbeigeführten Änderung der elektrokortikalen Hirnfunktion adulter Ratten zunächst eine Abnahme der in Nah-Infrarot-Spektroskopie ermittelten Oxidation der COX (Komplex IV) (Hoshi et al. 1997) und der, mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie simultan bestimmten, verminderten Konzentrationen energiereicher Phosphate, wie ATP und PCr (Matsumoto et al. 1996), im Hirngewebe voraus. Wong-Riley et al. (1989) postulierten einen engen Zusammenhang zwischen der histozytochemischen Verteilung der COX (Komplex IV) im Hirngewebe und der neuronalen Aktivität. Die Korrelation von erhöhter neuronaler Aktivität und erhöhter metabolischer Aktivität, zeigte sich auch postnatal im zerebralen Kortex am sich entwickelnden Gehirn von Ratten durch den verstärkten histozytochemischen Nachweis der COX in Regionen mit erhöhter neuronaler Aktivität (Riddle et al. 1993). Die Induktion hypoxisch-ischämischer Hirnschäden in neugeborenen, unreifen Ratten zeigte auch für den Gehalt des High-Turnover-Proteins MAP2 eine strenge Korrelation zum Verlust der energiereichen Phosphate ATP und PCr (Vannucci et al. 2004). Am fetalen Schaf wurde für die oxygraphisch ermittelte, verminderte Funktion isolierter Mitochondrien und den verminderten MAP2-Gehalt von Neuronen in hypoxisch-ischämischen Arealen des zerebralen Kortex eine deutliche Korrelation gezeigt (Puka-Sundvall et al. 2000).

Endgültige Angaben zur biologischen Bedeutung der von uns beobachteten Enzymaktivitätsminderungen der Atmungskettenkomplexe I + III und IV im zerebralen Kortex des fetalen Hirngewebes nach antenataler Betamethasongabe lassen sich anhand der von uns durchgeführten Aktivitätsmessungen alleine nicht treffen.

#### **5.2.4 Glukokortikoideffekte auf die Konzentration von ATP**

Um die funktionelle Bedeutung für den zellulären Energiegehalt der von uns beobachteten Aktivitätsminderungen nach antenataler Betamethasongabe, in der klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung eingesetzten Dosis, im zerebralen Kortex zu beurteilen, sollten die ATP-Konzentrationen im Hirngewebe der zuvor untersuchten Regionen zerebraler Kortex, Thalamus, Striatum und Hippokampus bestimmt werden. Die von uns mittels Absorptionsspektrometrie im zerebralen Kortex und im Thalamus fetaler Schafe gemessenen

ATP-Konzentrationen fielen dabei, im Vergleich zu den ATP-Gewebekonzentrationen im Hirngewebe von fetalen (Berger et al. 1996, Maulik et al. 1999, Vannucci und Wolf 1977, Vannucci et al. 1978), neonatalen und adulten Klein- und Nagetieren (Tuor et al. 1995, Tuor et al. 1997, Vannucci et al. 1996, Vannucci et al. 1997, Vannucci und Duffy 1974, Vannucci und Duffy 1976, Vannucci et al. 2004, Vannucci und Vannucci 1978, Vannucci et al. 1987, Yager und Asselin 1996, Yager et al. 1992a) sowie von neonatalen und adulten Großtieren, wie z. B. Schweinen und Hunden (Bauer et al. 1998, Vannucci et al. 1980, Vannucci et al. 1981, Yager et al. 1992b), sehr gering aus (s. Kap. 4.2.2 und 5.1.4). So betrugen die gemessenen ATP-Konzentrationen im Hirngewebe von Kontrolltieren gerade ein Zehntel bis ein Fünftel der für die ATP-Konzentration in tierischen Geweben im Allgemeinen als gegeben angenommenen unteren Normgrenze von 1 mmol/l (Bergmeyer und Bergmeyer 1989). Im Striatum und im Hippokampus war aufgrund der zu geringen Gewebemenge keine absorptionspektrophotometrische Messung der ATP-Konzentrationen möglich.

Die geringen ATP-Gewebekonzentrationen ließen darauf schließen, dass bedingt durch eine wenn auch nur Sekunden dauernde Entnahmezeit (das für die ATP-Bestimmung geforderte in-situ-Gefrieren (Trautschold et al. 1989) war aufgrund der technischen Besonderheiten bei der Entnahme von fetalem Gewebe nicht möglich) sowie längere Transportwege und -zeiten (USA-Deutschland), auch ohne Unterbrechung der Gefrierkette, nicht kontrollierbare Temperaturschwankungen zu ATP-Verlusten geführt hatten. Damit lassen sich anhand der von uns erzielten Ergebnisse leider keine zuverlässigen Aussagen zu den Effekten der antenatalen Betamethasongabe auf die ATP-Konzentrationen im Hirngewebe fetaler Schafe treffen. Dennoch gaben die mit steigender Betamethasondosis erhöhten ATP-Konzentrationen im zerebralen Kortex und im Thalamus interessante Hinweise darauf, dass Glukokortikoide ATP-Verluste in den Hirngewebsproben verzögern. Dies passt zu den katabolen Wirkung von Betamethason auf den Stoffwechsel.

Die gegenüber den unbehandelten Tieren erhöhten ATP-Konzentrationen nach Betamethasongabe ließen darauf schließen, dass die beschriebenen, unvorhergesehenen ATP-Verluste in den von uns untersuchten Hirngeweben durch Betamethason verzögert wurden. Die Verzögerung des ATP-Abfalls nach hypoxisch-ischämischen Insulten durch die vorherige Gabe von Glukokortikoiden ist bereits selektiv für das unreife Hirngewebe von juvenilen Ratten gezeigt worden, die nach der Dexamethasongabe auch weniger ausgeprägte Schädigungen des Hirngewebes zeigten (Tuor und Del Bigio 1996, Tuor et al. 1997). Im reifen Hirngewebe adulter Tiere dagegen war ein solcher protektiver Effekt durch

Dexamethason nicht zu beobachten, die ATP-Konzentrationen fielen nach der Induktion des hypoxisch-ischämischen Insultes im reifen Hirngewebe von mit Dexamethason behandelten Ratten und in den Kontrolltieren gleichermaßen schnell ab (Tuor et al. 1997). Der protektive Effekt von Dexamethason war innerhalb der ersten 48 h nach der Gabe und nur im unreifen Hirngewebe zu beobachten, so dass er als protektiver Faktor für das fetale Gehirn unter der Geburt eine wichtige Rolle spielen kann. Unter dem Stress der Geburt, unter dem die Wehentätigkeit und die Minderung der placentaren Durchblutung zur verminderten Versorgung des Feten mit Sauerstoffen und Nährstoffen führen, kann es leicht zu hypoxischen und ischämischen Zuständen kommen. Die spezifisch im fetalen Hirngewebe auftretende Verzögerung des ATP-Verlustes würde also unter der Geburt durch die vor der Geburt physiologisch erhöhten Glukokortikoidspiegel einen gewissen Schutz vor den möglichen Folgen der Hypoxie und Ischämie und somit vor den resultierenden Hirnschäden bieten.

Die Mechanismen der Verzögerung des hypoxisch-ischämisch bedingten ATP-Verlustes durch Glukokortikoide im unreifen Hirngewebe von Ratten sind unklar. Eine wichtige Rolle spielt dabei aber vermutlich die durch Glukokortikoide erhöhte Glukosekonzentration im fetalen Plasma (Tuor et al. 1993), die als Substrat für die kompensatorisch gesteigerte anaerobe Glykolyse im neuralen Gewebe benötigt wird (Nabetani et al. 1995, Vannucci et al. 1996).

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Einfluss der antenatalen Glukokortikoidtherapie zur Induktion der fetalen Lungenreifung bei von Frühgeburt bedrohten Babys auf die Funktion von Enzymkomplexen der mitochondrialen Atmungskette im fetalen Gehirn gezeigt werden. Die Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe im Hirngewebe fetaler Schafe ergaben selektiv im zerebralen Kortex eine spezifische Hemmung der Komplexe I und IV der Atmungskette durch Betamethason. Die Hemmung der Atmungskettenkomplexe beschränkte sich auf Komplexe, deren katalytische Untereinheiten nicht nur durch das nukleäre, sondern auch durch das mitochondriale Genom kodiert sind. Damit war die Hemmung der Atmungskettenkomplexe I und IV wahrscheinlich durch mitochondrial-genomische Mechanismen der Glukokortikoidwirkungen vermittelt. Die Hemmung von Komplex I (Morin et al. 2000) und Komplex IV (Bennett et al. 1996) durch Glukokortikoide in Dosierungen, die sowohl unter als auch über den von uns verwendeten Dosierungen lagen und deren Gabe z.T. auch chronisch erfolgte, ist bereits in isolierten Mitochondrien aus dem Hirngewebe adulter Ratten, jedoch bisher nicht im unfraktionierten Homogenat des fetalen Hirngewebes und nicht durch die Gabe von synthetischen Glukokortikoiden in der klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung angewandten Dosis gezeigt worden.

Da in der vorliegenden Studie die gleiche Betamethasonkonzentration verwendet wurde, wie sie auch in der Klinik zur Induktion der fetalen Lungenreifung routinemäßig eingesetzt wird (NIH 1995), und da diese Therapie am gleichen Tiermodell, in welchem wir auch unsere Untersuchungen durchführten, entwickelt wurde (Liggins 1969), sind die Ergebnisse von großer klinischer Relevanz. Der besondere Wert liegt in der, unseres Wissens nach, erstmaligen Bestimmung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe im sich entwickelnden gyrierten Gehirn während der Fetalperiode.

Trotz der zunehmenden Kenntnis über die Nebenwirkungen der antenatalen Glukokortikoidtherapie sind Dosis-Wirkungs-Beziehungen auch hinsichtlich des gewünschten Effektes auf die Lungenreifung bisher nicht untersucht worden. Die Hemmung der Komplexe I und IV durch Betamethason, die dosisunabhängig sowohl nach der klinisch verabreichten Dosis als auch nach der halben und der viertel Dosis auftrat, weist darauf hin, dass die in der klinischen Praxis verwendete Dosis zumindest bezüglich der Effekte auf die mitochondriale Atmungskette supramaximal ist. Die eingeschränkte Funktion der

Atmungskettenkomplexe hat einen potentiell hemmenden Effekt auf die ATP-Synthese im zerebralen Kortex. Da uns die Bestimmung der ATP-Konzentrationen wahrscheinlich aufgrund einer unzureichenden Konservierung der energiereichen Metabolite bei der Probenentnahme in den USA nicht gelang, ist dies in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, denn das aus der Hemmung der Atmungskettenkomplexe potentiell resultierende zelluläre Energiedefizit ist möglicherweise an der Entstehung akuter zerebraler Nebenwirkungen der antenatalen Glukokortikoidtherapie, wie die veränderte elektrokortikale Hirnfunktion (Schwab et al. 2001a), der Verlust von High-Turnover-Proteinen (Antonow-Schlorke et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2003, Schwab et al. 2001b) und die verminderte zerebrale Durchblutung (Löhle et al. 2005, Schwab et al. 2000), beteiligt.

Mit unseren Untersuchungen haben wir damit eine potentielle Ursache für eine Vielzahl der beschriebenen akuten zerebralen Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie gefunden. Es empfehlen sich unbedingt Dosis-Wirkungs-Untersuchungen sowohl hinsichtlich der erwünschten als auch unerwünschten Betamethason-Effekte, um die minimale noch wirksame und damit Nebenwirkungs-ärmste Dosierung zu finden. Bis dahin sollte die Indikation zu der für den Feten lebensrettenden Therapie möglichst eng gestellt werden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Abbasi S, Hirsch D, Davis J, Tolosa J, Stouffer N, Debbs R, Gerdes JS. 2000.** Effect of single versus multiple courses of antenatal corticosteroids on maternal and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*, 182 (5):1243-1249.
- Adam-Vizi V. 2005.** Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*, 7 (9-10):1140-1149.
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. 2006.** Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*, 27 (12):639-645.
- Agarwal R, Chiswick ML, Rimmer S, Taylor GM, McNally RJ, Alston RD, D'Souza SW. 2002.** Antenatal steroids are associated with a reduction in the incidence of cerebral white matter lesions in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 86 (2):F96-F101.
- Agrawal HC, Davis JM, Himwich WA. 1968.** Water content of dog brain parts in relation to maturation of the brain. *Am J Physiol*, 215 (4):846-848.
- Ahima RS, Harlan RE. 1990.** Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39 (3):579-604.
- Alexis MN, Stylianopoulou F, Kitraki E, Sekeris CE. 1983.** The distribution and properties of the glucocorticoid receptor from rat brain and pituitary. *J Biol Chem*, 258 (8):4710-4714.
- Almeida A, Brooks KJ, Sammut I, Keelan J, Davey GP, Clark JB, Bates TE. 1995.** Postnatal development of the complexes of the electron transport chain in synaptic mitochondria from rat brain. *Dev Neurosci*, 17 (4):212-218.
- Alonso G. 2000.** Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia*, 31 (3):219-231.
- Alston TA, Mela L, Bright HJ. 1977.** 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (9):3767-3771.
- Ananth CV, Joseph KS, Oyelese Y, Demissie K, Vintzileos AM. 2005.** Trends in preterm birth and perinatal mortality among singletons: United States, 1989 through 2000. *Obstet Gynecol*, 105 (5 Pt 1):1084-1091.



- Anderson DF, Stock MK, Rankin JH. 1979.** Placental transfer of dexamethasone in near-term sheep. *J Dev Physiol*, 1 (6):431-436.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290 (5806):457-465.
- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003.** Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol*, 547 (Pt 1):117-123.
- Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2001.** Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci Lett*, 297 (3):147-150.
- Antonow-Schlorke I, Ebert M, Muller T, Schubert H, Gschanes A, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2006.** Glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 like immunoreactivities in the fetal sheep brain are not reduced by maternal betamethasone treatment. *Neurosci Lett*, 403 (3):261-265.
- Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW. 1999.** Betamethasone-mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Am J Physiol*, 276 (4 Pt 2):H1137-1143.
- Arnold SE, Trojanowski JQ. 1996.** Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol*, 367 (2):293-307.
- Arrigoni O, Singer TP. 1962.** Limitations of the phenazine methosulphate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature*, 193:1256-1258.
- Astrom KE. 1967.** On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res*, 26:1-59.
- Attardi G, Schatz G. 1988.** Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, 4:289-333.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. 1995.** Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270 (5234):286-290.
- Babcock GT, Wikström M. 1992.** Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356 (6367):301-309.
- Ballard PL, Ballard RA. 1995.** Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):254-262.

- Bamberger CM, Schulte HM. 1997.** [Mechanisms of action of glucocorticoids]. *Internist (Berl)*, 38 (4):366-370.
- Bandy B, Davison AJ. 1990.** Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med*, 8 (6):523-539.
- Banks BA, Cnaan A, Morgan MA, Parer JT, Merrill JD, Ballard PL, Ballard RA. 1999.** Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Am J Obstet Gynecol*, 181 (3):709-717.
- Barker DJ. 1998.** In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, 95 (2):115-128.
- Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. 1990.** Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Bmj*, 301 (6746):259-262.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. 1993.** Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36 (1):62-67.
- Barnes PJ. 1998.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, 94 (6):557-572.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC. 1994.** A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, 120 (5):1097-1108.
- Barrientos A. 2002.** In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods*, 26 (4):307-316.
- Barrientos A, Casademont J, Rotig A, Miro O, Urbano-Marquez A, Rustin P, Cardellach F. 1996.** Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 229 (2):536-539.
- Bates TE, Almeida A, Heales SJ, Clark JB. 1994.** Postnatal development of the complexes of the electron transport chain in isolated rat brain mitochondria. *Dev Neurosci*, 16 (5-6):321-327.
- Bauer R, Walter B, Gaser E, Rosel T, Kluge H, Zwiener U. 1998.** Cardiovascular function and brain metabolites in normal weight and intrauterine growth restricted newborn piglets--effect of mild hypoxia. *Exp Toxicol Pathol*, 50 (4-6):294-300.
- Beato M, Chavez S, Truss M. 1996.** Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61 (4):240-251.

- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage JP, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R. 2006.** Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291 (6):C1172-1182.
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997.** Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46 (2):161-166.
- Bennet L, Kozuma S, McGarrigle HH, Hanson MA. 1999.** Temporal changes in fetal cardiovascular, behavioural, metabolic and endocrine responses to maternally administered dexamethasone in the late gestation fetal sheep. *Br J Obstet Gynaecol*, 106 (4):331-339.
- Bennett MC, Mlady GW, Fleshner M, Rose GM. 1996.** Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (3):1330-1334.
- Bennett MC, Diamond DM, Stryker SL, Parks JK, Parker WD, Jr. 1992.** Cytochrome oxidase inhibition: a novel animal model of Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 5 (2):93-101.
- Berger R, Garnier Y. 1998.** Pathophysiologie perinataler Hirnschäden. *Der Gynäkologe*, 31 (8):661-679.
- Berger R, Djuricic B, Jensen A, Hossmann KA, Paschen W. 1996.** Ontogenetic differences in energy metabolism and inhibition of protein synthesis in hippocampal slices during in vitro ischemia and 24 h of recovery. *Brain Res Dev Brain Res*, 91 (2):281-291.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J. 1989.** Metabolites 2: tri- and dicarboxylic acids, purines, pyrimidines and derivatives, coenzymes, inorganic compounds. 3te Aufl. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. 1994.** Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 26 (5):509-517.
- Birch-Machin MA, Briggs HL, Saborido AA, Bindoff LA, Turnbull DM. 1994.** An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol*, 51 (1):35-42.
- Blanford AT, Murphy BE. 1977.** In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 127 (3):264-267.

- Blondel B, Kogan MD, Alexander GR, Dattani N, Kramer MS, Macfarlane A, Wen SW. 2002.** The impact of the increasing number of multiple births on the rates of preterm birth and low birthweight: an international study. *Am J Public Health*, 92 (8):1323-1330.
- Boekema EJ, Braun HP. 2007.** Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem*, 282 (1):1-4.
- Boggs JM. 2006.** Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci*, 63 (17):1945-1961.
- Bohn MC, Friedrich VL, Jr. 1982.** Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol. *J Neurosci*, 2 (9):1292-1298.
- Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. 2001.** Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol*, 32 (1):76-91.
- Bonanno C, Fuchs K, Wapner RJ. 2007.** Single versus repeat courses of antenatal steroids to improve neonatal outcomes: risks and benefits. *Obstet Gynecol Surv*, 62 (4):261-271.
- Bossy-Wetzel E, Green DR. 1999.** Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem*, 274 (25):17484-17490.
- Bostick WD, Ausmus BS. 1978.** Methodologies for the determination of adenosine phosphates. *Anal Biochem*, 88 (1):78-92.
- Bowes SB, Jackson NC, Papachristodoulou D, Umpleby AM, Sonksen PH. 1996.** Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Endocrinol*, 148 (3):501-507.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz W, Schwab M. 2004.** Time and dose dependent effects of antenatal glucocorticoids on cell birth and death in the fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Investig*, 11 (Suppl.):533.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz W, Schwab M. 2003.** Association of programmed cell death and glucocorticoid receptors during brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig*, 10 (Suppl.):765.
- Brooks AN, Hagan DM, Howe DC. 1996.** Neuroendocrine regulation of pituitary-adrenal function during fetal life. *Eur J Endocrinol*, 135 (2):153-165.
- Brown MR, Sullivan PG, Geddes JW. 2006.** Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca<sup>2+</sup> overload than nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem*, 281 (17):11658-11668.

- Burton PJ, Waddell BJ. 1999.** Dual function of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod*, 60 (2):234-240.
- Buttgereit F. 2000.** Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions. *Z Rheumatol*, 59 Suppl 2:II/119-123.
- Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. 2000.** Therapeutically targeting lymphocyte energy metabolism by high-dose glucocorticoids. *Biochem Pharmacol*, 59 (6):597-603.
- Bywood PT, Johnson SM. 2000.** Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol*, 161 (1):306-316.
- Cai J, Yang J, Jones DP. 1998.** Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*, 1366 (1-2):139-149.
- Canterino JC, Verma U, Visintainer PF, Elimian A, Klein SA, Tejani N. 2001.** Antenatal steroids and neonatal periventricular leukomalacia. *Obstet Gynecol*, 97 (1):135-139.
- Capaldi RA. 1990a.** Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 280 (2):252-262.
- Capaldi RA. 1990b.** Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem*, 59:569-596.
- Carlos RQ, Seidler FJ, Slotkin TA. 1992.** Fetal dexamethasone exposure alters macromolecular characteristics of rat brain development: a critical period for regionally selective alterations? *Teratology*, 46 (1):45-59.
- Casademont J, Perea M, Lopez S, Beato A, Miro O, Cardellach F. 2004.** Enzymatic diagnosis of oxidative phosphorylation defects on muscle biopsy: better on tissue homogenate or on a mitochondria-enriched suspension? *Med Sci Monit*, 10 (9):CS49-53.
- Cavalieri RL, Cohen WR. 2006.** Antenatal steroid therapy: have we undervalued the risks? *J Matern Fetal Neonatal Med*, 19 (5):265-269.
- Challis JR, Brooks AN. 1989.** Maturation and activation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in fetal sheep. *Endocr Rev*, 10 (2):182-204.
- Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001.** The fetal-placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and postnatal health. *Mol Cell Endocrinol*, 185 (1-2):135-144.
- Chandel N, Budinger GR, Kemp RA, Schumacker PT. 1995.** Inhibition of cytochrome-c oxidase activity during prolonged hypoxia. *Am J Physiol*, 268 (6 Pt 1):L918-925.

- Chen YZ, Qiu J. 2001.** Possible genomic consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. *News Physiol Sci*, 16:292-296.
- Chen YZ, Hua SY, Wang CA, Wu LG, Gu Q, Xing BR. 1991.** An electrophysiological study on the membrane receptor-mediated action of glucocorticoids in mammalian neurons. *Neuroendocrinology*, 53 Suppl 1:25-30.
- Chretien D, Rustin P. 2003.** Mitochondrial oxidative phosphorylation: pitfalls and tips in measuring and interpreting enzyme activities. *J Inherit Metab Dis*, 26 (2-3):189-198.
- Chretien D, Rustin P, Bourgeron T, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. 1994.** Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin Chim Acta*, 228 (1):53-70.
- Chretien D, Gallego J, Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Munnich A, Rotig A, Rustin P. 1998.** Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. *Biochem J*, 329 ( Pt 2):249-254.
- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustaffsson JA, Fuxe K. 1994.** Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 62 (3):843-897.
- Colberg C, Antonow-Schlorke I, Muller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2004.** Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0.75 of gestation. *Neurosci Lett*, 364 (2):130-134.
- Crowley P. 2000.** Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD000065.
- Dafny N, Phillips MI, Taylor AN, Gilman S. 1973.** Dose effects of cortisol on single unit activity in hypothalamus, reticular formation and hippocampus of freely behaving rats correlated with plasma steroid levels. *Brain Res*, 59:257-272.
- Dancis J, Jansen V, Levitz M. 1980.** Placental transfer of steroids: effect of binding to serum albumin and to placenta. *Am J Physiol*, 238 (3):E208-213.
- Davey GP, Clark JB. 1996.** Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem*, 66 (4):1617-1624.
- Davey GP, Peuchen S, Clark JB. 1998.** Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem*, 273 (21):12753-12757.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1993.** Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol*, 13 (4):433-455.

- de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, Benayoun E, Chretien D, Kadhon N, Lombes A, de Baulny HO, Niaudet P, Munnich A, Rustin P, Rotig A. 2001.** A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet*, 29 (1):57-60.
- Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF. 1999.** Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol*, 19 (6 Pt 1):419-425.
- Demonacos C, Djordjevic-Markovic R, Tsawdaroglou N, Sekeris CE. 1995.** The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 55 (1):43-55.
- Demonacos C, Tsawdaroglou NC, Djordjevic-Markovic R, Papalopoulou M, Galanopoulos V, Papadogeorgaki S, Sekeris CE. 1993.** Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46 (3):401-413.
- Demonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE. 1996.** Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, 61 (4):226-232.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997.** A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol*, 499 ( Pt 1):217-226.
- Dobbing J, Sands J. 1979.** Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3 (1):79-83.
- Doyle P, Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994.** Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res*, 645 (1-2):225-230.
- Duclos M, Gouarne C, Martin C, Rocher C, Mormede P, Letellier T. 2004.** Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286 (2):E159-167.

- Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. 2003.** Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br J Nutr*, 90 (5):969-977.
- Duval D, Durant S, Homo-Delarche F. 1983.** Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta*, 737 (3-4):409-442.
- Eberhardt W, Kilz T. 2003.** [On genomic and nongenomic effects. Molecular basis of glucocorticoid action]. *Pharm Unserer Zeit*, 32 (4):288-294.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N. 1999.** Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol*, 93 (2):174-179.
- Elimian A, Garry D, Figueroa R, Spitzer A, Wiencek V, Quirk JG. 2007.** Antenatal betamethasone compared with dexamethasone (betacode trial): a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 110 (1):26-30.
- Elston T, Wang H, Oster G. 1998.** Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 391 (6666):510-513.
- Erecinska M, Silver IA. 1989.** ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9 (1):2-19.
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA. 2004.** Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol*, 73 (6):397-445.
- Evans SJ, Murray TF, Moore FL. 2000.** Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72 (5):209-221.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000.** Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52 (4):513-556.
- Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO, Hoppel CL. 1999.** Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 372 (2):399-407.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Stadhouders AM, Trijbels JM, Sengers RC, Janssen AJ, Veerkamp JH. 1985.** Investigation of mitochondrial metabolism in small human skeletal muscle biopsy specimens. Improvement of preparation procedure. *Clin Chim Acta*, 145 (1):89-99.
- Frank L, Lewis PL, Sosenko IR. 1985.** Dexamethasone stimulation of fetal rat lung antioxidant enzyme activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics*, 75 (3):569-574.



- Frasch MG, Muller T, Wicher C, Weiss C, Lohle M, Schwab K, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007.** Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol*, 579 (Pt 3):893-907.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999.** Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (1 Pt 1):114-121.
- Frey TG, Mannella CA. 2000.** The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25 (7):319-324.
- Friese K, Dudenhausen JW, Kirschner W, Schafer A, Elkeles T. 2003.** [Risk factors of premature birth and their significance for prevention and health promotion--an analysis based on the BabyCare Program]. *Gesundheitswesen*, 65 (8-9):477-485.
- Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Harfstrand A, Wikstrom AC, Okret S, Zoli M, Miller LS, Greene JL, Gustafsson JA. 1987.** Studies on the cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor and estrogen receptor immunoreactivity in the central nervous system of the rat and their relationship to the monoaminergic and peptidergic neurons of the brain. *J Steroid Biochem*, 27 (1-3):159-170.
- Gallitelli MF, Schultz M, Isenberg G, Rudolf F. 1999.** Twitch-potential increases calcium in peripheral more than in central mitochondria of guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, 518 ( Pt 2):433-447.
- Garcia MV, Cabezas JA, Perez-Gonzalez MN. 1985.** Alterations in the activities of subcellular fractions marker enzymes in rat liver and brain by hydrocortisone and corticosterone treatment. *Int J Biochem*, 17 (2):203-208.
- Gavrilova-Jordan LP, Price TM. 2007.** Actions of steroids in mitochondria. *Semin Reprod Med*, 25 (3):154-164.
- Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Muller T, Neudecker S, Zierz S. 2002.** Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta*, 1556 (1):41-52.
- Gellerich FN, Kapschke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K. 1994.** The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem*, 133-134:85-104.

- Gellerich FN, Trumbeckaite S, Muller T, Deschauer M, Chen Y, Gizatullina Z, Zierz S. 2004.** Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem*, 256-257 (1-2):391-405.
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. 1998.** Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol*, 201 (Pt 8):1129-1139.
- Goldenberg RL. 2002.** The management of preterm labor. *Obstet Gynecol*, 100 (5 Pt 1):1020-1037.
- Goldenberg RL, Rouse DJ. 1998.** Prevention of premature birth. *N Engl J Med*, 339 (5):313-320.
- Gordon-Weeks PR. 1993.** Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. *J Neurocytol*, 22 (9):717-725.
- Göttlicher M, Heck S, Herrlich P. 1998.** Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*, 76 (7):480-489.
- Gray MW. 1993.** Origin and evolution of organelle genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 3 (6):884-890.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 1999.** Mitochondrial evolution. *Science*, 283 (5407):1476-1481.
- Green DR, Reed JC. 1998.** Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281 (5381):1309-1312.
- Gross I. 1990.** Regulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol*, 259 (6 Pt 1):L337-344.
- Gumbinas M, Oda M, Huttenlocher P. 1973.** The effects of corticosteroids on myelination of the developing rat brain. *Biol Neonate*, 22 (5):355-366.
- Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawski E. 1991.** Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *N Engl J Med*, 325 (4):231-237.
- Hägerhäll C. 1997.** Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*, 1320 (2):107-141.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. 1998.** Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*, 1366 (1-2):79-94.
- Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. 2000.** Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans*, 28 (2):170-177.

- Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. 2006.** Births: preliminary data for 2005. *Natl Vital Stat Rep*, 55 (11):1-18.
- Hanley NR, Van de Kar LD. 2003.** Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic--pituitary-adrenal axis in health and disease. *Vitam Horm*, 66:189-255.
- Hannavy K, Rospert S, Schatz G. 1993.** Protein import into mitochondria: a paradigm for the translocation of polypeptides across membranes. *Curr Opin Cell Biol*, 5 (4):694-700.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996.** Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140 (1):43-52.
- Hatefi Y. 1985.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54:1015-1069.
- Hatefi Y, Rieske JS. 1967.** The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol*, 10:225-231.
- Helgert A. 2006.** Der zeitliche Verlauf der Myelinisierung im Gehirn des Schaffeten – Effekte von Betamethason [Dissertationsschrift]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Horn M, Vollandt R. 1995.** Multiple Tests und Auswahlverfahren. Aufl. Stuttgart: Fischer.
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. 1990.** Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology*, 52 (1):57-64.
- Horsefield R, Iwata S, Byrne B. 2004.** Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci*, 5 (2):107-118.
- Hoshi Y, Hazeki O, Kakihana Y, Tamura M. 1997.** Redox behavior of cytochrome oxidase in the rat brain measured by near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol*, 83 (6):1842-1848.
- Hossmann KA, Schuier FJ. 1980.** Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*, 11 (6):583-592.
- Hua SY, Chen YZ. 1989.** Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology*, 124 (2):687-691.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001.** Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci*, 19 (4):415-425.
- Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 1999.** Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol*, 94 (2):213-218.
- Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. 2004.** Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull*, 130 (1):115-142.

- Ioannou IM, Tsawdaroglou N, Sekeris CE. 1988.** Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome. *Anticancer Res*, 8 (6):1405-1409.
- Jani MS, Telang SD, Katyare SS. 1991.** Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 38 (5):587-591.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. 2006.** Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*, 29 (4):499-515.
- Jobe AH. 1993.** Pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med*, 328 (12):861-868.
- Jobe AH, Soll RF. 2004.** Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. *Am J Obstet Gynecol*, 190 (4):878-881.
- Jobe AH, Mitchell BR, Gunkel JH. 1993.** Beneficial effects of the combined use of prenatal corticosteroids and postnatal surfactant on preterm infants. *Am J Obstet Gynecol*, 168 (2):508-513.
- Joels M, de Kloet ER. 1992.** Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci*, 15 (1):25-30.
- Joels M, de Kloet ER. 1994.** Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*, 43 (1):1-36.
- Johnson GV, Jope RS. 1992.** The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res*, 33 (4):505-512.
- Joseph KS, Demissie K, Kramer MS. 2002.** Obstetric intervention, stillbirth, and preterm birth. *Semin Perinatol*, 26 (4):250-259.
- Kaal EC, Vecht CJ. 2004.** The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol*, 16 (6):593-600.
- Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS. 1994.** Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics*, 93 (5):730-736.
- Katyare SS, Balasubramanian S, Parmar DV. 2003.** Effect of corticosterone treatment on mitochondrial oxidative energy metabolism in developing rat brain. *Exp Neurol*, 183 (1):241-248.
- Kavanagh J, Kelly AJ, Thomas J. 2006.** Corticosteroids for cervical ripening and induction of labour. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD003100.
- Kawata M, Yuri K, Ozawa H, Nishi M, Ito T, Hu Z, Lu H, Yoshida M. 1998.** Steroid hormones and their receptors in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65 (1-6):273-280.
- Kelly MM. 2006.** The basics of prematurity. *J Pediatr Health Care*, 20 (4):238-244.

- Kennedy JD. 1999.** Lung function outcome in children of premature birth. *J Paediatr Child Health*, 35 (6):516-521.
- Kimberg DV, Loud AV, Wiener J. 1968.** Cortisone-induced alterations in mitochondrial function and structure. *J Cell Biol*, 37 (1):63-79.
- Klein-Hitpass L, Schwerk C, Kahmann S, Vassen L. 1998.** Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins. *J Mol Med*, 76 (7):490-496.
- Koenen SV, Mecenas CA, Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW. 2002.** Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):812-817.
- Koufali MM, Moutsatsou P, Sekeris CE, Breen KC. 2003.** The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*, 209 (1-2):51-60.
- Kramer KA, Oglesbee D, Hartman SJ, Huey J, Anderson B, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, Robinson BH, Cameron JM, Hahn SH. 2005.** Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. *Clin Chem*, 51 (11):2110-2116.
- Krozowski Z. 1999.** The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol*, 151 (1-2):121-127.
- Kuan J, Saier MH, Jr. 1993.** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 28 (3):209-233.
- Kunz WS, Kuznetsov AV, Clark JF, Tracey I, Elger CE. 1999.** Metabolic consequences of the cytochrome c oxidase deficiency in brain of copper-deficient Mo(vbr) mice. *J Neurochem*, 72 (4):1580-1585.
- Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA. 2005.** Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol*, 207 (4):436-444.
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R. 1989.** Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 280 (2):197-212.

- Lefai E, Terrier-Cayre A, Vincent A, Boespflug-Tanguy O, Tanguy A, Alziari S. 1995.** Enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes from children muscular biopsies. Age-related evolutions. *Biochim Biophys Acta*, 1228 (1):43-50.
- Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A. 2006.** Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta*, 1757 (9-10):1406-1420.
- Leong SF, Clark JB. 1984a.** Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J*, 218 (1):131-138.
- Leong SF, Clark JB. 1984b.** Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism. *Biochem J*, 218 (1):139-145.
- Letellier T, Durrieu G, Malgat M, Rossignol R, Antoch J, Deshouillers JM, Coquet M, Lacombe D, Netter JC, Pedespan JM, Redonnet-Vernhet I, Mazat JP. 2000.** Statistical analysis of mitochondrial pathologies in childhood: identification of deficiencies using principal component analysis. *Lab Invest*, 80 (7):1019-1030.
- Levitz M, Jansen V, Dancis J. 1978.** The transfer and metabolism of corticosteroids in the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 132 (4):363-366.
- Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. 2001.** Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation*, 104 (20):2492-2497.
- Liggins GC. 1969.** Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*, 45 (4):515-523.
- Liggins GC. 1976.** Adrenocortical-related maturational events in the fetus. *Am J Obstet Gynecol*, 126 (7):931-941.
- Liggins GC. 1994a.** The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev*, 6 (2):141-150.
- Liggins GC. 1994b.** Fetal lung maturation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 34 (3):247-250.
- Liggins GC, Howie RN. 1972.** A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50 (4):515-525.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86 (1):147-157.
- Löffler G, Petrides PE. 1998.** *Biochemie und Pathobiochemie*. 6te Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.

- Löhle M, Muller T, Wicher C, Roedel M, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2005.** Betamethasone effects on fetal sheep cerebral blood flow are not dependent on maturation of cerebrovascular system and pituitary-adrenal axis. *J Physiol*, 564 (Pt 2):575-588.
- Lombardi A, Damon M, Vincent A, Goglia F, Herpin P. 2000.** Characterisation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle mitochondria subpopulations in pig: a study using top-down elasticity analysis. *FEBS Lett*, 475 (2):84-88.
- Lowry OH, Passonneau JV. 1972.** A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York,
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275.
- Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE. 1993.** F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J*, 295 ( Pt 3):799-806.
- MacDorman MF, Minino AM, Strobino DM, Guyer B. 2002.** Annual summary of vital statistics--2001. *Pediatrics*, 110 (6):1037-1052.
- Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA. 1992.** Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 182 (2):703-711.
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD. 1992.** Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain*, 115 ( Pt 2):333-342.
- Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ. 1996.** Mitochondrial dysfunction after fetal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (6):1029-1032.
- Marone JR, Falduto MT, Essig DA, Hickson RC. 1994.** Effects of glucocorticoids and endurance training on cytochrome oxidase expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 77 (4):1685-1690.
- Martens ME, Peterson PL, Lee CP. 1991.** In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1058 (2):152-160.
- Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. 2005.** Annual summary of vital statistics--2003. *Pediatrics*, 115 (3):619-634.

- Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. 2002.** Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*, 34 (4):348-357.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. 1998.** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281 (5385):2027-2031.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R. 1994.** Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 174 (1):67-72.
- Matsumoto H, Oda T, Hossain MA, Yoshimura N. 1996.** Does the redox state of cytochrome aa3 reflect brain energy level during hypoxia? Simultaneous measurements by near infrared spectrophotometry and <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anesth Analg*, 83 (3):513-518.
- Matthews SG. 2001.** Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin Neonatol*, 6 (4):309-317.
- Maulik D, Zanelli S, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. 1999.** Oxygen free radical generation during in-utero hypoxia in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration. *Brain Res*, 817 (1-2):117-122.
- Maurer I, Zierz S, Moller HJ. 2000.** A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*, 21 (3):455-462.
- Maurer I, Zierz S, Moller H. 2001.** Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, 48 (1):125-136.
- Max SR, Mill J, Mearow K, Konagaya M, Konagaya Y, Thomas JW, Banner C, Vitkovic L. 1988.** Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*, 255 (3 Pt 1):E397-402.
- Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, Morkuniene R. 1997.** Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol Cell Biochem*, 174 (1-2):143-148.
- McCallum J, Smith N, MacLachlan JN, Coksaygan T, Schwab M, Nathanielsz P, Richardson BS. 2008.** Effects of antenatal glucocorticoids on cerebral protein synthesis in the preterm ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol*, 198 (1):103 e101-106.
- McEwen BS. 1991.** Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*, 12 (4):141-147.



- McEwen BS. 1994a.** How do sex and stress hormones affect nerve cells? *Ann N Y Acad Sci*, 743:1-16; discussion 17-18.
- McEwen BS. 1994b.** Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? *Horm Behav*, 28 (4):396-405.
- McGimsey WC, Cidlowski JA, Stumpf WE, Sar M. 1991.** Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology*, 129 (6):3064-3072.
- McKay LI, Cidlowski JA. 1999.** Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 20 (4):435-459.
- McMillen IC, Robinson JS. 2005.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*, 85 (2):571-633.
- Meadow WL, Bell A, Sunstein CR. 2003.** Statistics, not memories: what was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet Gynecol*, 102 (2):356-362.
- Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip AG, Duncan CC, Makuch RW. 1995.** Antenatal steroids, delivery mode, and intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol*, 172 (3):795-800.
- Mitchell P. 1961.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144-148.
- Mjaatvedt AE, Wong-Riley MT. 1988.** Relationship between synaptogenesis and cytochrome oxidase activity in Purkinje cells of the developing rat cerebellum. *J Comp Neurol*, 277 (2):155-182.
- Molnar J, Howe DC, Nijland MJ, Nathanielsz PW. 2003.** Prenatal dexamethasone leads to both endothelial dysfunction and vasodilatory compensation in sheep. *J Physiol*, 547 (Pt 1):61-66.
- Moore FL, Evans SJ. 1999.** Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence. *Brain Behav Evol*, 54 (1):41-50.
- Moore FL, Orchinik M, Lowry C. 1995.** Functional studies of corticosterone receptors in neuronal membranes. *Receptor*, 5 (1):21-28.
- Morin C, Zini R, Simon N, Charbonnier P, Tillement JP, Le Louet H. 2000.** Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain

mitochondria: an additional effect of dexamethasone. *Fundam Clin Pharmacol*, 14 (5):493-500.

**Moss TJ, Doherty DA, Nitsos I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP. 2005.** Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 192 (1):146-152.

**Moutsatsou P, Psarra AM, Tsiapara A, Paraskevakou H, Davaris P, Sekeris CE. 2001.** Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 386 (1):69-78.

**Mulder EJ, Derks JB, Visser GH. 1997.** Antenatal corticosteroid therapy and fetal behaviour: a randomised study of the effects of betamethasone and dexamethasone. *Br J Obstet Gynaecol*, 104 (11):1239-1247.

**Murphy KE. 2007.** Betamethasone compared with dexamethasone for preterm birth: a call for trials. *Obstet Gynecol*, 110 (1):7-9.

**Nabetani M, Okada Y, Kawai S, Nakamura H. 1995.** Neural activity and the levels of high energy phosphates during deprivation of oxygen and/or glucose in hippocampal slices of immature and adult rats. *Int J Dev Neurosci*, 13 (1):3-12.

**Nagamatsu S, Sawa H, Kamada K, Nakamichi Y, Yoshimoto K, Hoshino T. 1993.** Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett*, 334 (3):289-295.

**Nakai A, Asakura H, Taniuchi Y, Koshino T, Araki T, Siesjo BK. 2000.** Effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN) on fetal cerebral energy metabolism during intrauterine ischemia and reperfusion in rats. *Pediatr Res*, 47 (4 Pt 1):451-456.

**Nakai A, Shibazaki Y, Taniuchi Y, Oya A, Asakura H, Koshino T, Araki T. 2002.** Effect of dexamethasone on mitochondrial maturation in the fetal rat brain. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (3):574-578.

**Nakao N, Nakai K, Itakura T. 1998.** Changes in the mitochondrial enzyme activity in striatal projection areas after unilateral excitotoxic striatal lesions: partial restoration by embryonic striatal transplants. *Exp Neurol*, 153 (2):268-276.

**Nassogne MC, Evrard P, Courtoy PJ. 1995.** Selective neuronal toxicity of cocaine in embryonic mouse brain cocultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24):11029-11033.

**Nathanielsz PW. 1984.** Animal models in fetal medicine (III). Vierte Aufl. Ithaca: Perinatology Press.

- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. 1986.** Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol*, 103 (6 Pt 1):2511-2527.
- Newman JP, Peebles DM, Harding SR, Springett R, Hanson MA. 2000.** Hemodynamic and metabolic responses to moderate asphyxia in brain and skeletal muscle of late-gestation fetal sheep. *J Appl Physiol*, 88 (1):82-90.
- Nichols KV, Gross I. 1992.** Fluid lung development and amniotic fluid phospholipid analysis. In: Reece EA, Hrsg. *Medicine of the fetus & mother*. 1te Aufl. Philadelphia: Lippincott, 117-119.
- NIH. 1995.** Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes. *Jama*, 273 (5):413-418.
- NIH. 2000.** Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement 2000, August 17-18. *17* (2):1-10.
- Noraberg J, Zimmer J. 1998.** Ethanol induces MAP2 changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroreport*, 9 (14):3177-3182.
- Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G, Pebay-Peyroula E. 2006.** Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem*, 75:713-741.
- Nyirenda MJ, Seckl JR. 1998.** Intrauterine events and the programming of adulthood disease: The role of fetal glucocorticoid exposure (Review). *Int J Mol Med*, 2 (5):607-614.
- Odedra BR, Bates PC, Millward DJ. 1983.** Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J*, 214 (2):617-627.
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL. 1991.** A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science*, 252 (5014):1848-1851.
- Orchinik M, Moore FL, Rose JD. 1994.** Mechanistic and functional studies of rapid corticosteroid actions. *Ann N Y Acad Sci*, 746:101-112; discussion 112-104.
- Orchinik M, Murray TF, Franklin PH, Moore FL. 1992.** Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (9):3830-3834.
- Packan DR, Sapolsky RM. 1990.** Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology*, 51 (6):613-618.

- Pandya JD, Agarwal NA, Katyare SS. 2007.** Dexamethasone treatment differentially affects the oxidative energy metabolism of rat brain mitochondria in developing and adult animals. *Int J Dev Neurosci*, 25 (5):309-316.
- Papiernik E, Zeitlin J, Rivera L, Bucourt M, Topuz B. 2003.** Preterm birth in a French population: the importance of births by medical decision. *Bjog*, 110 (4):430-432.
- Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. 1990.** Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem*, 265 (29):18035-18040.
- Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL. 1994.** Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem*, 269 (49):31041-31046.
- Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G. 1996.** Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*, 396 (1):7-13.
- Pfaff DW, Silva MT, Weiss JM. 1971.** Telemetered recording of hormone effects on hippocampal neurons. *Science*, 172 (981):394-395.
- Phelka AD, Beck MJ, Philbert MA. 2003.** 1,3-Dinitrobenzene inhibits mitochondrial complex II in rat and mouse brainstem and cortical astrocytes. *Neurotoxicology*, 24 (3):403-415.
- Piccoli C, Scrima R, Boffoli D, Capitanio N. 2006.** Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochem J*, 396 (3):573-583.
- Pitkanen S, Robinson BH. 1996.** Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest*, 98 (2):345-351.
- Polyakov A, Cohen S, Baum M, Trickey D, Jolley D, Wallace EM. 2007.** Patterns of antenatal corticosteroid prescribing 1998-2004. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 47 (1):42-45.
- Poyton RO, McEwen JE. 1996.** Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem*, 65:563-607.
- Pratt L, Magness RR, Phernetton T, Hendricks SK, Abbott DH, Bird IM. 1999.** Repeated use of betamethasone in rabbits: effects of treatment variation on adrenal suppression, pulmonary maturation, and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (4):995-1005.

- Psarra AM, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Sekeris CE, Tsacopoulos M. 2003.** Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Muller) cells in the salamander retina. *Glia*, 41 (1):38-49.
- Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H. 2000.** Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res*, 125 (1-2):43-50.
- Quinlivan JA, Archer MA, Dunlop SA, Evans SF, Beazley LD, Newnham JP. 1998.** Fetal growth retardation, particularly within lymphoid organs, following repeated maternal injections of betamethasone in sheep. *J Obstet Gynaecol Res*, 24 (3):173-182.
- Rahman S, Taanman JW, Cooper JM, Nelson I, Hargreaves I, Meunier B, Hanna MG, Garcia JJ, Capaldi RA, Lake BD, Leonard JV, Schapira AH. 1999.** A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet*, 65 (4):1030-1039.
- Rasmussen HN, Rasmussen UF. 1997.** Small scale preparation of skeletal muscle mitochondria, criteria of integrity, and assays with reference to tissue function. *Mol Cell Biochem*, 174 (1-2):55-60.
- Rayburn WF, Christensen HD, Gonzalez CL. 1997.** A placebo-controlled comparison between betamethasone and dexamethasone for fetal maturation: differences in neurobehavioral development of mice offspring. *Am J Obstet Gynecol*, 176 (4):842-850; discussion 850-841.
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. 1986.** Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *Embo J*, 5 (3):535-541.
- Reinhardt B, Coksaygan T, Müller T, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz W, Schwab M. 2007.** Effects of clinical doses of betamethasone used to enhance fetal lung maturation on cerebral blood flow in fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig*, 14 (Suppl.):532.
- Repka MX. 2002.** Ophthalmological problems of the premature infant. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8 (4):249-257.
- Rich PR. 2003.** The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans*, 31 (Pt 6):1095-1105.
- Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D. 1993.** Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci*, 13 (10):4193-4213.

- Roberts D, Dalziel S. 2006.** Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, 3:CD004454.
- Robinson BH, Glerum DM, Chow W, Petrova-Benedict R, Lightowlers R, Capaldi R. 1990.** The use of skin fibroblast cultures in the detection of respiratory chain defects in patients with lacticacidemia. *Pediatr Res*, 28 (5):549-555.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L. 1985.** Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *Am J Physiol*, 249 (4 Pt 1):E345-349.
- Rossignol R, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. 1999.** Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem*, 274 (47):33426-33432.
- Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P. 2004.** Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment. *Biochem J*, 382 (Pt 2):491-499.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Wucher A, Saudubray JM, Rotig A, Munnich A. 1991.** Assessment of the mitochondrial respiratory chain. *Lancet*, 338 (8758):60.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. 1994.** Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228 (1):35-51.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990.** Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 10 (9):2897-2902.
- Saraste M. 1999.** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, 283 (5407):1488-1493.
- Sauerwald A, Rath W. 2000.** [Lung maturation therapy with glucocorticoids in threatened premature labor. Considerations of risk-benefit in evidence-based medicine]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 204 (6):203-209.
- Schapira AH. 1998.** Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1366 (1-2):225-233.
- Schatz G. 1992.** Protein import by yeast mitochondria. *Prog Clin Biol Res*, 375:1-8.
- Schatz G. 1995.** Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1271 (1):123-126.
- Scheffler IE. 2001.** Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev*, 49 (1-2):3-26.
- Scheller K, Seibel P, Sekeris CE. 2003.** Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int Rev Cytol*, 222:1-61.

- Schleussner E, Arnscheidt C, Müller T, Schneider U, Haueisen J, Schwab K, Schwab M. 2004.** Effects of antenatal glucocorticoids on human fetal cortical function detected by fetal magnetencephalography. *J Soc Gynecol Investig*, 11 (Supl.):69A-412A.
- Scholte HR, Yu Y, Ross JD, Oosterkamp, II, Boonman AM, Busch HF. 1997.** Rapid isolation of muscle and heart mitochondria, the lability of oxidative phosphorylation and attempts to stabilize the process in vitro by taurine, carnitine and other compounds. *Mol Cell Biochem*, 174 (1-2):61-66.
- Schömig E, Taubert D. 2007.** Pharmaka zur Therapie von Funktionsstörungen der endokrinen Organe (Hormone, Hormonanaloge u.a.). In: Estler C-J, Schmidt H, Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis*. 6te Aufl. Stuttgart/New York: Schattauer, 637-643.
- Schwab M. 2007.** Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von zerebralen Funktionsstörungen. *Gynäkologe*, 40:256-263.
- Schwab M, Coksaygan T, Samtani MN, Jusko WJ, Nathanielsz PW. 2006a.** Kinetics of betamethasone and fetal cardiovascular adverse effects in pregnant sheep after different doses. *Obstet Gynecol*, 108 (3 Pt 1):617-625.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Mueller T, Schubert H, Anwar MA, Nathaniels PW. 2001a.** Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol*, 531 (Pt 2):535-543.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. 2000.** Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol*, 528 (Pt 3):619-632.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001b.** Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol*, 530 (Pt 3):497-506.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Müller T, Löhle M, Wood CE, Schubert H, Nathanielsz W, Witte OW. 2004.** Glucocorticoid (GC) induced maturation of cerebral autoregulation may explain the decreased incidence of intraventricular hemorrhage (IVH) and increased risk of periventricular leukomalacia (PVL). *Soc Neurosci*, 821:4.
- Schwab M, Groh T, Schwab K, Müller T, Cocksaygan T, Frasch MG, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz W. 2006b.** Effects of antenatal glucocorticoids on functional brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig*, 13 (Supl.):731.

- Schwerzmann K, Hoppeler H, Kayar SR, Weibel ER. 1989.** Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (5):1583-1587.
- Scully JL, Otten U. 1995.** Glucocorticoids, neurotrophins and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52 (5):391-401.
- Segui-Real B, Stuart RA, Neupert W. 1992.** Transport of proteins into the various subcompartments of mitochondria. *FEBS Lett*, 313 (1):2-7.
- Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R, Ville Y. 1998.** Effect of dexamethasone and betamethasone on fetal heart rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol*, 105 (7):749-755.
- Servidei S, Lazaro RP, Bonilla E, Barron KD, Zeviani M, DiMauro S. 1987.** Mitochondrial encephalomyopathy and partial cytochrome c oxidase deficiency. *Neurology*, 37 (1):58-63.
- Shams M, Kilby MD, Somerset DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, Afnan M, Stewart PM. 1998.** 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum Reprod*, 13 (4):799-804.
- Shepherd D, Garland PB. 1969.** The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*, 114 (3):597-610.
- Simon N, Jolliet P, Morin C, Zini R, Urien S, Tillement JP. 1998.** Glucocorticoids decrease cytochrome c oxidase activity of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett*, 435 (1):25-28.
- Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V. 2003.** Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *J Neurochem*, 84 (1):112-118.
- Slinde E, Morild E, Flatmark T. 1975.** A general and rational approach to the optimal recovery of mitochondria by differential centrifugation in homogenous media. *Anal Biochem*, 66 (1):151-158.
- Sloboda DM, Challis JR, Moss TJ, Newnham JP. 2005.** Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. *Curr Pharm Des*, 11 (11):1459-1472.
- Slotkin TA, Lappi SE, McCook EC, Tayyeb MI, Eylers JP, Seidler FJ. 1992.** Glucocorticoids and the development of neuronal function: effects of prenatal dexamethasone exposure on central noradrenergic activity. *Biol Neonate*, 61 (5):326-336.



- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Sapolsky RM, Phares C, Craddock SD, Brooke SM, Mattson MP. 1996.** Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (4):585-598.
- Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L, Zeman J. 2006.** Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res*, 55 Suppl 2:S27-41.
- Sun B, Jobe A, Rider E, Ikegami M. 1993.** Single dose versus two doses of betamethasone for lung maturation in preterm rabbits. *Pediatr Res*, 33 (3):256-260.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397 (6718):441-446.
- Szczesna-Kaczmarek A, Litwinska D, Popinigis J. 1984.** Oxidation of NADH via an "external" pathway in skeletal-muscle mitochondria and its possible role in the repayment of lactacid oxygen debt. *Int J Biochem*, 16 (12):1231-1235.
- Sze PY, Iqbal Z. 1994.** Glucocorticoid action on depolarization-dependent calcium influx in brain synaptosomes. *Neuroendocrinology*, 59 (5):457-465.
- Szewczyk A, Wojtczak L. 2002.** Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*, 54 (1):101-127.
- Szuran TF, van Haarst AD, de Kloet ER, Pliska V. 1997.** Steroid receptors in the rat hippocampus: a note to the methodology of their binding assay. *J Recept Signal Transduct Res*, 17 (1-3):337-354.
- Taanman JW. 1999.** The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410 (2):103-123.
- Tai TC, Tompa J, Nobrega JN, Adamson SL. 1995.** Changes in regional cytochrome oxidase activity in the fetal, newborn and adult ovine brainstem. *Brain Res Dev Brain Res*, 86 (1-2):7-15.
- Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992.** Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol*, 77 (5):709-717.
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H. 1988.** Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*, 242 (4881):1050-1053.

- Thorburn DR, Smeitink J. 2001.** Diagnosis of mitochondrial disorders: clinical and biochemical approach. *J Inher Metab Dis*, 24 (2):312-316.
- Tisdal HD. 1967.** Preparation and properties of succinic cytochrome reductase (complex II-III). *Methods Enzymol*, 10:213-215.
- Tombaugh GC, Yang SH, Swanson RA, Sapolsky RM. 1992.** Glucocorticoids exacerbate hypoxic and hypoglycemic hippocampal injury in vitro: biochemical correlates and a role for astrocytes. *J Neurochem*, 59 (1):137-146.
- Tough SC, Newburn-Cook C, Johnston DW, Svenson LW, Rose S, Belik J. 2002.** Delayed childbearing and its impact on population rate changes in lower birth weight, multiple birth, and preterm delivery. *Pediatrics*, 109 (3):399-403.
- Trautschold I, Lamprecht W, Schweitzer G. 1989.** ATP: UV-method mit Hexokinase. In: Bergmeyer HU, Hrsg. *Methods of Enzymatic Analysis, Metabolites 2*. Dritte Aufl. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 346 -357.
- Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. 2004.** Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 29 (3):569-577.
- Trojaborg W, Boysen G. 1973.** Relation between EEG, regional cerebral blood flow and internal carotid artery pressure during carotid endarterectomy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 34 (1):61-69.
- Tsai MJ, O'Malley BW. 1994.** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63:451-486.
- Tsiriyotis C, Spandidos DA, Sekeris CE. 1997.** The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric genes transfected in LATK- cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 235 (2):349-354.
- Tucker RP, Binder LI, Matus AI. 1988.** Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord. *J Comp Neurol*, 271 (1):44-55.
- Tuor UI, Del Bigio MR. 1996.** Protection against hypoxic-ischemic damage with corticosterone and dexamethasone: inhibition of effect by a glucocorticoid antagonist RU38486. *Brain Res*, 743 (1-2):258-262.
- Tuor UI, Chumas PD, Del Bigio MR. 1995.** Prevention of hypoxic-ischemic damage with dexamethasone is dependent on age and not influenced by fasting. *Exp Neurol*, 132 (1):116-122.

- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, Del Bigio MR. 1997.** Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem*, 69 (5):1954-1963.
- Tuor UI, Simone CS, Arellano R, Tanswell K, Post M. 1993.** Glucocorticoid prevention of neonatal hypoxic-ischemic damage: role of hyperglycemia and antioxidant enzymes. *Brain Res*, 604 (1-2):165-172.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994.** Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28 (4):336-348.
- Van Itallie CM. 1990.** Thyroid hormone and dexamethasone increase the levels of a messenger ribonucleic acid for a mitochondrially encoded subunit but not for a nuclear-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Endocrinology*, 127 (1):55-62.
- Vannucci RC, Duffy TE. 1974.** Influence of birth on carbohydrate and energy metabolism in rat brain. *Am J Physiol*, 226 (4):933-940.
- Vannucci RC, Duffy TE. 1976.** Carbohydrate metabolism in fetal and neonatal rat brain during anoxia and recovery. *Am J Physiol*, 230 (5):1269-1275.
- Vannucci RC, Wolf JW. 1977.** Oxidative metabolism in fetal rat brain during maternal halothane anesthesia. *Environ Health Perspect*, 21:215-219.
- Vannucci RC, Vannucci SJ. 1978.** Cerebral carbohydrate metabolism during hypoglycemia and anoxia in newborn rats. *Ann Neurol*, 4 (1):73-79.
- Vannucci RC, Wolf JW, Vannucci SJ. 1978.** Oxidative metabolism in fetal rat brain during maternal nitrous oxide anesthesia. *Brain Res*, 147 (2):416-421.
- Vannucci RC, Nardis EE, Vannucci SJ. 1980.** Cerebral metabolism during hypoglycemia and asphyxia in newborn dogs. *Biol Neonate*, 38 (5-6):276-286.
- Vannucci RC, Vasta F, Vannucci SJ. 1987.** Cerebral metabolic responses of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*, 21 (6):524-529.
- Vannucci RC, Christensen MA, Stein DT. 1989.** Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*, 26 (3):208-214.
- Vannucci RC, Yager JY, Vannucci SJ. 1994.** Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14 (2):279-288.
- Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. 1996.** The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (5):1026-1033.

- Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. 1997.** Effect of carbon dioxide on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *Pediatr Res*, 42 (1):24-29.
- Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. 2004.** Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (10):1090-1097.
- Vannucci RC, Nardis EE, Vannucci SJ, Campbell PA. 1981.** Cerebral carbohydrate and energy metabolism during hypoglycemia in newborn dogs. *Am J Physiol*, 240 (3):R192-199.
- Viereck C, Tucker RP, Binder LI, Matus A. 1988.** Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience*, 26 (3):893-904.
- Villani G, Greco M, Papa S, Attardi G. 1998.** Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem*, 273 (48):31829-31836.
- Virgin CE, Jr., Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC, Sapolsky RM. 1991.** Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem*, 57 (4):1422-1428.
- Vogel H. 2001.** Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (3):217-227.
- Vohr BR, Wright LL, Poole WK, McDonald SA. 2005.** Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants <32 weeks' gestation between 1993 and 1998. *Pediatrics*, 116 (3):635-643.
- von Harnack G-A, Koletzko B. 2000.** *Kinderheilkunde*. 11.te Aufl. Berlin: Springer.
- Wallace DC. 1982.** Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev*, 46 (2):208-240.
- Wallace DC. 1999.** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283 (5407):1482-1488.
- Wapner RJ, Waters T. 2003.** Introduction and historical perspective. *Clin Obstet Gynecol*, 46 (1):125-131.
- Ward RM. 1994.** Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clin Perinatol*, 21 (3):523-542.
- Warner BB, Kiely JL, Donovan EF. 2000.** Multiple births and outcome. *Clin Perinatol*, 27 (2):347-361, ix.
- Weber K, Bruck P, Mikes Z, Kupper JH, Klingenspor M, Wiesner RJ. 2002.** Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology*, 143 (1):177-184.

- Wehling M. 1997.** Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 59:365-393.
- Weinstock M. 2001.** Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol*, 65 (5):427-451.
- Welberg LA, Seckl JR. 2001.** Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13 (2):113-128.
- Wen SW, Smith G, Yang Q, Walker M. 2004.** Epidemiology of preterm birth and neonatal outcome. *Semin Fetal Neonatal Med*, 9 (6):429-435.
- Wharton DC, Tzagoloff A. 1967.** Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol*, 10:245-250.
- Wiedenmann B, Franke WW. 1985.** Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41 (3):1017-1028.
- Willems JL, Monnens LA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Meyer AE, van Dam K, van Haelst U. 1977.** Leigh's encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue. *Pediatrics*, 60 (6):850-857.
- Wilson JE. 1972.** The relationship glycolytic and mitochondrial enzymes in the developing rat brain. *J Neurochem*, 19 (1):223-227.
- Wintour EM, Johnson K, Koukoulas I, Moritz K, Tersteeg M, Dodic M. 2003a.** Programming the cardiovascular system, kidney and the brain--a review. *Placenta*, 24 Suppl A:S65-71.
- Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, Ricardo S, Samuel CS, Dodic M. 2003b.** Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol*, 549 (Pt 3):929-935.
- Wolf NI, Smeitink JA. 2002.** Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology*, 59 (9):1402-1405.
- Wong-Riley MT. 1989.** Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*, 12 (3):94-101.
- Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR. 2000.** Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med*, 343 (6):378-384.
- Yaffe MP, Schatz G. 1984.** Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (15):4819-4823.

- Yager JY. 2004.** Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol*, 11 (1):31-46.
- Yager JY, Asselin J. 1996.** Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Stroke*, 27 (5):919-925; discussion 926.
- Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. 1992a.** Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol*, 262 (3 Pt 2):H672-677.
- Yager JY, Shuaib A, Thornhill J. 1996.** The effect of age on susceptibility to brain damage in a model of global hemispheric hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 93 (1-2):143-154.
- Yager JY, Brucklacher RM, Mulsce DJ, Vannucci RC. 1992b.** Cerebral oxidative metabolism during hypothermia and circulatory arrest in newborn dogs. *Pediatr Res*, 32 (5):547-552.
- Yager JY, Kala G, Hertz L, Juurlink BH. 1994.** Correlation between content of high-energy phosphates and hypoxic-ischemic damage in immature and mature astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res*, 82 (1-2):62-68.
- Yager JY, Armstrong EA, Miyashita H, Wirrell EC. 2002.** Prolonged neonatal seizures exacerbate hypoxic-ischemic brain damage: correlation with cerebral energy metabolism and excitatory amino acid release. *Dev Neurosci*, 24 (5):367-381.
- Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990.** Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology*, 126 (1):11-17.
- Youssef JA, Badr MZ. 1992.** Disruption of mitochondrial energetics and DNA synthesis by the anti-AIDS drug dideoxyinosine. *Toxicol Lett*, 60 (2):197-202.
- Zalman LS, Nikaido H, Kagawa Y. 1980.** Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J Biol Chem*, 255 (5):1771-1774.
- Zoratti M, Szabo I. 1995.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1241 (2):139-176.

# DANKSAGUNG

Für die Vergabe des Themas danke ich:

PD Dr. med. habil Matthias Schwab

Für die Öffnung des Mitochondrienlabors und die Möglichkeit die Aktivitätsmessungen durchzuführen danke ich:

PD Dr. med. Iris Maurer

Für geduldige Erklärungen und zahllose Stunden der Beratung gilt mein aufrichtiger Dank:

Prof. em. Harald Kluge

An dieser Stelle möchte ich mich auch recht herzlich bei Dr. Christian Bollensdorf für die ständige Hilfe und den unermüdlichen Einsatz bedanken.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und auch bei meinen Freunden bedanken, die stets für mich da waren und mit unendlicher Geduld immer den nötigen Rückhalt geben konnten und mir Unterstützung jeglicher Art zukommen ließen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben:

---

Name:	Gunther Wichmann
Geburtsdatum:	30.03.1980
Geburtsort:	Beckendorf-Neindorf
Familienstand:	ledig
Adresse:	Windebergerstrasse 95 99974 Mühlhausen
Email:	<u><a href="mailto:Gunther.Wichmann@t-online.de">Gunther.Wichmann@t-online.de</a></u>

## Schulische Ausbildung:

---

1986 – 1988:	<b>Ernst-Thälmann-Schule</b> , Mühlhausen
1988 – 1991	<b>Karl-Liebknecht-Schule</b> , Mühlhausen
1991 – 1998:	<b>Tilesius – Gymnasium</b> , Mühlhausen

## Wehrersatzdienst:

---

11/1998 – 11/1999	<b>Zivildienst als Hilfspflegekraft</b> Abteilung für Innere Medizin II, Unstrut-Hainich- Kreiskrankenhaus
-------------------	--

## Studium:

---

10/1999:	Beginn des Medizinstudiums an der <b>Friedrich – Schiller – Universität Jena</b>
09/2001:	Ärztliche Vorprüfung
09/2002:	1. Staatsexamen
09/2004:	2. Staatsexamen
10/2006:	3. Staatsexamen

Jena, 06.02.2008



# EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgenden Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr PD Dr. med. habil Matthias Schwab  
Klinik für Neurologie  
Friedrich – Schiller – Universität Jena

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.02.2008